



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Medicina

## TESIS DOCTORAL

**Impacto de los polimorfismos en genes de la inmunidad  
natural en el desarrollo de hepatocarcinoma y su  
evolución tras el trasplante hepático**



Sara de la Fuente Moral  
Diciembre 2016



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Tesis doctoral

**Impacto de los polimorfismos en genes de la inmunidad  
natural en el desarrollo de hepatocarcinoma y su  
evolución tras el trasplante hepático**

Presentada por:

Sara de la Fuente Moral

Directores:

Prof. Valentín Cuervas-Mons Martínez  
Doctor en Medicina

Dra. María Jesús Citores Sánchez  
Doctora en Biología

Prof. Valentín Cuervas-Mons Martínez, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Dra. María Jesús Citores Sánchez, doctora en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Certifican que Doña Sara de la Fuente Moral, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid, con DNI 46932265Y, ha trabajado bajo nuestra dirección en la elaboración de su trabajo para la obtención del grado de Doctor, titulado *“Impacto de los polimorfismos en genes de la inmunidad natural en el desarrollo de hepatocarcinoma y su evolución tras el trasplante hepático”*, considerando que se encuentra en las debidas condiciones para ser presentada como Tesis Doctoral ante el tribunal que proceda.

Madrid, 31 de octubre de 2016

Prof. Valentín Cuervas-Mons Martínez

Doctor en Medicina

Dra. María Jesús Citores Sánchez

Doctora en Biología

*A mis padres,*

*A mis directores*

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Haber concluido un trabajo tan arduo y lleno de dificultades, aunque también de satisfacciones, como una tesis doctoral, no habría sido posible sin el ánimo y la ayuda de todas las personas que, de distintas formas, han contribuido a su desarrollo. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todos ellos.

En primer lugar, tengo que dar las gracias a mis directores. Gracias Valentín por tu confianza, que ha estado presente de forma constante, incluso en esos momentos en que no la encontraba en mí misma. Por tu insistencia, casi obstinación, que ha conseguido que, como muchos de mis compañeros, esté hoy escribiendo la última página de mi tesis doctoral. Gracias María Jesús por tu paciencia, tu disponibilidad, tus múltiples revisiones y por haberme acompañado, desde el principio, con una sonrisa que no se ha borrado, pese a todo.

Gracias Álex, mi compañero de la vida. Por todo. También por esto, aunque no sea, desde luego, la cosa más importante por la que te estoy agradecida. Gracias a Ana Duca, compañera de buceo en las historias clínicas. Gracias Alfonso, por tus valiosas sugerencias en este trabajo y, sobre todo, por haberme enseñado tantas cosas. Gracias Carmen que, aunque en la recta final de esta tesis, has contribuido con tus brillantes consejos y tu punto de vista, realmente útil. Gracias también a Cris, Blanca, Álex Ramos, Ana Cuenca, Patri, Elena, Nati y a todos los compañeros que os habéis convertido en amigos, por vuestra compañía y ánimos a lo largo de estos años. Gracias a mis amigos, especialmente a Bea, por creer siempre en mí.

Y por último, gracias a mis padres, por haber hecho de mí el centro de su vida y de su esfuerzo, y por la confianza que siempre me han demostrado.

---

## ABREVIATURAS

---

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*

DAMP: *damage-associated molecular pattern*; patrones moleculares asociados a daño

DM: diabetes mellitus

GWAS: *genome-wide association study*, estudio de asociación del genoma completo

HCC: hepatocarcinoma

HUPHM: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

IC: intervalo de confianza

IFN: interferón

*IL28B*: Interleuquina 28B

MELD: *Model for End-stage Liver Disease*, modelo para la enfermedad hepática terminal

OR: *Odds ratio*

PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*; patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: polymerase chain reaction; reacción en cadena de la polimerasa

PRR: *pattern recognition receptor*; receptor de reconocimiento de patrones

RVS: respuesta viral sostenida

SNP: *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleótido único

TLR: *Toll-like receptor*; receptor Toll-like

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

---

# ÍNDICE

---

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Hepatocarcinoma	3
1.1 Epidemiología y etiología	3
1.2 Hepatocarcinoma relacionado con la infección por VHC	6
1.3 Hepatocarcinoma relacionado con la cirrosis alcohólica	7
1.4 Hepatocarcinoma y trasplante hepático	7
2. Infección por el virus de la hepatitis C	9
2.1 Epidemiología de la infección crónica por VHC	9
2.2 Evolución natural	11
3. Polimorfismos en el gen de la <i>Interleuquina 28B (IL28B)</i>	13
3.1 Interferon lambda (IFN-λ)	14
3.1.1 Actividad antiviral del IFN-λ	14
3.1.2 Actividad antitumoral del IFN-λ	15
4. Polimorfismos genéticos de los receptores Toll-like	17
4.1 Polimorfismos de TLRs y enfermedades infecciosas y autoinmunes	19
4.2 Polimorfismos de TLRs y cáncer	20
5. Hepatocarcinoma y polimorfismos genéticos en componentes de la inmunidad natural	21
<b>2 HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
1. Hipótesis y justificación	25
2. Objetivos	27

<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
1. Diseño y población del estudio	31
2. Definiciones y variables analizadas	33
2.1 Variable principal	33
2.2 Otras variables	33
3. Análisis de los polimorfismos	35
3.1 Selección de los polimorfismos	35
3.2 Procedencia de las muestras de ADN	35
3.3 Análisis de los polimorfismos	35
4. Análisis estadístico	37
5. Aspectos éticos	39
 <b>4 RESULTADOS</b>	 <b>41</b>
1. Proceso de selección de los pacientes	43
2. Características de los pacientes	45
2.1 Variables demográficas	45
2.2 Variables clínicas	45
2.3 Variables relacionadas con el virus en los pacientes con infección por VHC	46
3. Estudio de los casos de hepatocarcinoma	47
3.1 Estudio comparativo de los pacientes con HCC asociado a VHC o a alcohol	47
3.2 Estudio anatomopatológico de los hepatocarcinomas	48
4. Características demográficas y clínicas relacionadas con el desarrollo de hepatocarcinoma	51
4.1 Enfermedad relacionada con VHC	51
4.2 Cirrosis enólica	52
5. Polimorfismos de <i>IL28B</i> y TLRs	55
5.1 Estudio comparativo de la distribución genotípica de los polimorfismos de <i>IL28B</i> y de TLRs entre los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica	55
5.2 Implicación de los polimorfismos de <i>IL28B</i> y de TLRs en el desarrollo de HCC	59
6. Recidiva de HCC postrasplante	63
6.1 Factores relacionados con la recidiva del HCC	65



7. Estudio de la supervivencia	71
7.1 Supervivencia global	71
7.2 Influencia del HCC en la supervivencia	72
7.3 Factores relacionados con la supervivencia en pacientes con hepatocarcinoma	73
8. Resumen de resultados	85
8.1 Estudio comparativo de los pacientes con infección crónica por VHC y cirrosis alcohólica	85
8.2 Hepatocarcinoma	86
8.2.1 Variables relacionadas con el desarrollo de HCC	86
8.2.2 Recidiva de HCC postrasplante	86
8.3 Estudio de la supervivencia	87
<b>5 DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
1. Características de la población	91
2. Estudio comparativo de la distribución genotípica de los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica	93
2.1 Polimorfismos de <i>IL28B</i>	93
2.2 Polimorfismos de <i>TLRs</i>	94
3. Estudio anatomopatológico de los HCC	97
4. Factores relacionados con el desarrollo y el pronóstico del HCC	101
4.1 Factores relacionados con el desarrollo de HCC	103
4.1.1 Polimorfismos de <i>IL28B</i>	103
4.1.2 Polimorfismos de <i>TLRs</i>	107
4.2 Factores relacionados con el pronóstico del HCC	109
4.2.1 Recidiva del HCC postrasplante	110
4.2.2 Supervivencia en pacientes con HCC	113
5. Limitaciones	117
6. Implicaciones, aplicabilidad y contribución	119
<b>6 CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>125</b>
<b>8 ANEXOS</b>	<b>141</b>

---

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## ÍNDICE DE LA INTRODUCCIÓN

6. Hepatocarcinoma	3
6.1 Epidemiología y etiología	3
6.2 Hepatocarcinoma relacionado con la infección por VHC	6
6.3 Hepatocarcinoma relacionado con la cirrosis alcohólica	7
6.4 Hepatocarcinoma y trasplante hepático	7
7. Infección por el virus de la hepatitis C	9
7.1 Epidemiología de la infección crónica por VHC	9
7.2 Evolución natural	11
8. Polimorfismos en el gen de la <i>Interleuquina 28B (IL28B)</i>	13
3.2 Interferon lambda (INF- $\lambda$ )	14
3.2.1 Actividad antiviral del IFN- $\lambda$	14
3.2.2 Actividad antitumoral del IFN- $\lambda$	15
9. Polimorfismos genéticos de los receptores Toll-like	17
4.3 Polimorfismos de <i>TLRs</i> y enfermedades infecciosas y autoinmunes	19
4.4 Polimorfismos de <i>TLRs</i> y cáncer	20
10. Hepatocarcinoma y polimorfismos genéticos en componentes de la inmunidad natural	21

---

---

# 1. HEPATOCARCINOMA

---

## *1.1 Epidemiología y etiología*

El hepatocarcinoma (HCC) es el quinto tumor más frecuente en el mundo en varones y el noveno en mujeres, según la estimación de GLOBOCAN 2012 usando los últimos datos disponibles recogidos por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research in Cancer, IARC) y la Organización Mundial de la Salud<sup>1</sup>. El número de muertes por HCC es virtualmente idéntico a su incidencia, lo que refleja su letalidad. El HCC es la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo, estimándose que fue responsable de casi 750.000 muertes en 2012, un 9.1% del total de las muertes por cáncer.

En España, el HCC es el séptimo cáncer más frecuente en varones, según el último informe editado por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), presentado en el proyecto GLOBOCAN 2012<sup>1</sup> para la población española. Se diagnostican más de 5.500 nuevos casos de hepatocarcinoma al año, un 2,6% de los nuevos diagnósticos de cáncer. El HCC es responsable 5.000 muertes al año en España, lo que constituye un 4,4% de todas las muertes por cáncer.

El desarrollo de HCC está vinculado a la existencia de daño hepático crónico de cualquier etiología: hasta el 90% de los casos se desarrolla sobre hígado cirrótico. Existe una serie de factores de riesgo bien documentados para el desarrollo de HCC<sup>2</sup>:

- Infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) al que se atribuye, además del potencial de producir hepatopatía crónica, un papel oncogénico mediante la inserción de su material genético en el genoma celular y la acción oncogénica directa de determinadas proteínas virales, lo que explicaría la alta incidencia de HCC en zonas en las que la hepatitis B es endémica. En Asia, aunque más del 70% de los casos de HCC se producen en pacientes con cirrosis por VHB<sup>3</sup>, el riesgo de HCC está elevado entre 5 y 15 veces en los portadores crónicos de la hepatitis B<sup>4</sup>, e incluso los pacientes con hepatitis B oculta presentan un riesgo ligeramente superior de HCC al de la población general<sup>5</sup>. En estos dos últimos casos, el HCC se desarrolla sobre hígado sano, poniendo de manifiesto la capacidad oncogénica del propio virus.
- Infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC): es la causa más frecuente de HCC en Estados Unidos, Europa y el área mediterránea<sup>6</sup>. El VHC no presenta capacidad oncogénica, sino que el mecanismo etiopatogénico es el desarrollo de cirrosis en respuesta a la infección crónica.

- Toxinas ambientales, como las aflatoxinas presentes en cereales, legumbres y frutos secos, y las toxinas procedentes de algas azul verdosas que contaminan el agua.
- Cirrosis alcohólica<sup>7,8</sup>, cuyo papel en el desarrollo de HCC será revisado ampliamente en otro apartado de esta introducción.
- Esteatohepatitis no alcohólica, síndrome metabólico, obesidad y diabetes mellitus (DM). Hasta en el 30-40% de los pacientes con hepatopatía crónica no se reconocía ninguno de los factores clásicamente relacionados con su desarrollo. Actualmente, la enfermedad grasa no alcohólica del hígado es considerada la causante de la mayoría de los casos de cirrosis criptogénica y HCC asociado a la misma<sup>6</sup>.
- Cirrosis hepática de otro origen. Los pacientes con cirrosis hepática de cualquier etiología tienen un riesgo incrementado de HCC.

La práctica totalidad de los casos de HCC muestra relación con al menos uno de los factores de riesgo mencionados con anterioridad. Sin embargo, la mayor parte de los pacientes con infección crónica por VHB, VHC, consumo excesivo de alcohol o enfermedad grasa no alcohólica del hígado nunca desarrollará cirrosis o HCC. Este hecho hace sospechar la influencia del sustrato genético individual en la susceptibilidad al desarrollo de HCC.

El HCC muestra una distribución geográfica, étnica, etaria y por sexo singular, prácticamente única en la patología oncológica, determinada por la etiología específica. De este modo, en función de la exposición a los factores de riesgo mayores para la aparición de la enfermedad, se establecen tres categorías geográficas según la incidencia de HCC<sup>9</sup>:

- Áreas de alta incidencia (entre 15 y 100 casos por 100.000 habitantes y año): Este y Sudeste asiático y África subsahariana, donde el factor de riesgo predominante es la infección por el VHB, junto con la exposición a aflatoxinas.
- Áreas de mediana incidencia (entre 5 y 10 casos por 100.000 habitantes y año): países mediterráneos y norte de Brasil, donde los principales factores de riesgo son las infecciones crónicas por VHB y por VHC y el consumo de alcohol.
- Áreas de baja incidencia (menos de 5 casos por 100.000 habitantes y año): América, Australia y norte de Europa, vinculados en su mayoría a infección crónica por VHC, alcohol y enfermedad grasa no alcohólica del hígado.

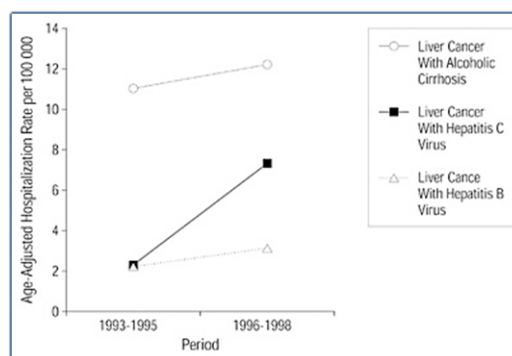
Más del 80% de los casos de HCC en el mundo se relacionan directamente con la infección crónica por los virus de la hepatitis B o C. La mitad de los casos anuales de HCC ocurren en China, reflejando la alta prevalencia de hepatitis B crónica.

La edad de aparición del HCC varía en función de la incidencia: se sitúa en torno a los 60 años en zonas de baja e intermedia incidencia, mientras que en las áreas de alta incidencia el HCC se desarrolla en el adulto joven. El HCC es más frecuente en varones, de nuevo con variaciones en función de la incidencia: tres varones por cada mujer en áreas de bajo riesgo, y 7 varones por cada mujer en zonas de alto riesgo.

La incidencia de HCC varía ampliamente entre la población de la misma área geográfica en función de la raza<sup>9</sup>. Por ejemplo, en Estados Unidos, para todas las edades y para ambos sexos, la tasa de HCC entre sujetos asiáticos dobla a la tasa registrada en afroamericanos, que a su vez es el doble que la observada en individuos de raza blanca. Lo mismo ocurre en Singapur, donde la incidencia de HCC entre los hombres de raza india triplica a la correspondiente a hombres de raza asiática. Esta enorme variabilidad étnica se debe, presumiblemente, a diferencias en la prevalencia y edad de exposición a los factores de riesgo mayores para el desarrollo de HCC y, de nuevo, pone de manifiesto la evidente contribución del sustrato genético.

En el mundo occidental, la mayoría de los HCC se deben a infección crónica por VHC, cirrosis alcohólica o enfermedad grasa no alcohólica del hígado<sup>6</sup>. A diferencia de lo que ocurre en las zonas de alta incidencia, donde se ha observado un descenso de los nuevos casos de HCC tras la introducción de programas universales de vacunación contra la hepatitis B, la incidencia de HCC está aumentando en Estados Unidos y Europa<sup>10,11</sup>. Esto es debido fundamentalmente a la epidemia de obesidad por una parte, y a la alta tasa de infección por VHC entre los años 1960 y 1990, relacionada con el uso de drogas por vía parenteral en las dos primeras décadas y a su extensión posterior a los bancos de hemoderivados hasta el desarrollo de un test de cribado en la década de los 90<sup>12</sup>. El periodo estimado desde la infección por VHC hasta el desarrollo de cirrosis es de 20 a 30 años; de todos los pacientes que adquirieron la infección, hasta el 30% desarrollará cirrosis, y casi el 5% HCC.

El HCC es, de hecho, la causa de muerte relacionada con el cáncer de más rápido crecimiento en las últimas décadas en Estados Unidos. Su incidencia ajustada por edad se ha incrementado más de dos veces entre 1985 y 2002<sup>13</sup>. Se han publicado cuatro estudios de grandes cohortes que analizan bases de datos nacionales con intención de examinar los cambios seculares en la incidencia de HCC en Estados Unidos<sup>14-17</sup>; en todos ellos el mayor incremento proporcional se produjo en los HCC relacionados con VHC (Figura 1).



**Figura 1:** Tasas de hepatocarcinoma ajustadas por edad en función de la etiología (tomado de El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. Arch Intern Med, 2000<sup>15</sup>). *Age-adjusted hospitalization rate per 100 000*: tasa de hospitalización ajustada a la edad por 100 000 personas. *Liver cancer with alcoholic cirrhosis*: HCC asociado a cirrosis alcohólica; *Liver cancer with Hepatitis C virus*: HCC asociado a VHC; *Liver cancer with Hepatitis B virus*: HCC asociado a VHB.

## 1.2 Hepatocarcinoma relacionado con la infección por VHC

La infección crónica por el VHC es responsable de alrededor de un tercio de todos los casos de HCC en el mundo<sup>18</sup>. En España, entre el 60 y el 75% de los HCC se relacionan con el VHC<sup>19</sup>, siendo la principal causa del mismo en nuestro medio.

A pesar de que la infección crónica por VHC es el principal factor de riesgo de HCC, sólo una pequeña proporción de los pacientes infectados desarrollarán HCC a lo largo de su vida. La tasa de desarrollo de HCC entre los individuos con infección crónica por VHC se estima en el 1-3% a los 30 años; sin embargo, entre los pacientes con cirrosis, la tasa de HCC se incrementa exponencialmente hasta el 4% al año<sup>20</sup>. Puesto que el virus no presenta propiedades oncogénicas, los factores determinantes de desarrollo de HCC en los pacientes infectados por VHC son sólo dependientes del huésped, lo que una vez más apoyaría la influencia genética en el desarrollo de la enfermedad. Además de los factores de riesgo clásicos, metabólicos y relacionados con la cinética viral, los polimorfismos genéticos de citoquinas y sus receptores, y de otras moléculas implicadas en la inmunomodulación, la inflamación y la homeostasis de la matriz extracelular, podrían explicar las amplias diferencias interindividuales en el daño hepático inducido por la infección crónica por VHC y en la susceptibilidad al desarrollo de HCC<sup>21-25</sup>.

En la actualidad, estamos asistiendo a una revolución en el tratamiento de la hepatitis C, que con toda probabilidad cambiará la historia natural de la enfermedad a medio plazo. Según algunos estudios, el tratamiento eficaz de la hepatitis C podría disminuir moderadamente el riesgo de HCC entre los pacientes con cirrosis por VHC<sup>26-27</sup>, pero la evidencia es aún débil. Como regla general, en los pacientes con cirrosis que consiguen aclarar el VHC, el riesgo de HCC se mantiene, y es necesario el cribado de estos enfermos de igual forma que en pacientes cirróticos de otras etiologías.

### 1.3 Hepatocarcinoma relacionado con la cirrosis alcohólica

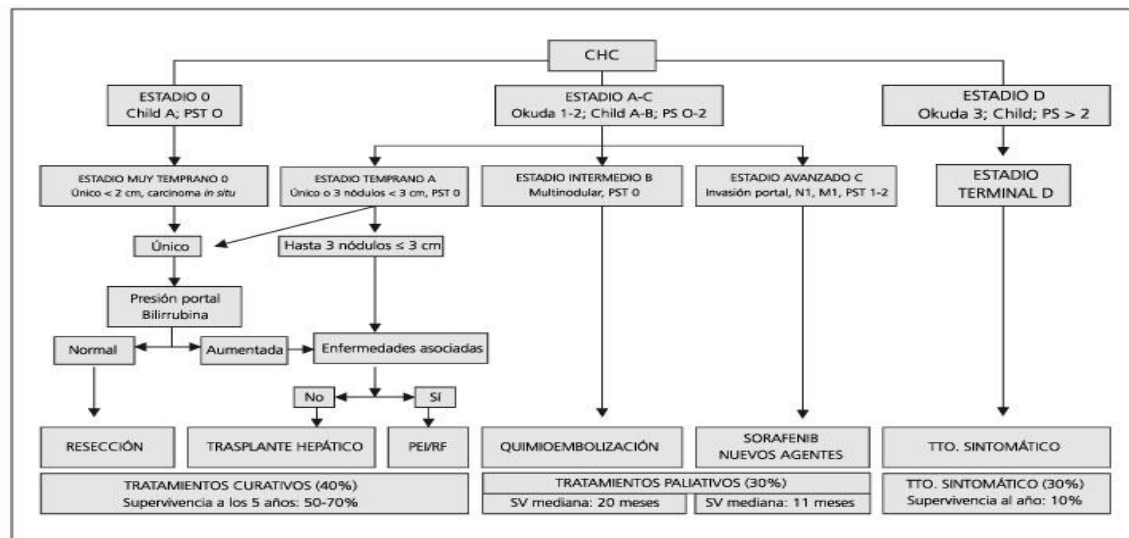
El consumo excesivo de alcohol se asocia con un espectro de enfermedades hepáticas que incluyen esteatosis, esteatohepatitis, cirrosis hepática y HCC. La cirrosis alcohólica se diagnostica con frecuencia en estadios avanzados, en forma de cirrosis descompensada, lo que impacta de forma negativa en la supervivencia<sup>28</sup>.

El riesgo de HCC aumenta alrededor de 5 veces cuando el consumo diario de alcohol es superior a 80 g/día durante más de 10 años<sup>7</sup>. Además, cualquier consumo de alcohol se comporta como un reconocido cofactor para el desarrollo de HCC cuando se añade a otro agente causante, como la hepatitis C, la hepatitis B o la diabetes<sup>8,29</sup>.

El abuso de alcohol es frecuente en Europa Occidental y América; en EEUU, hasta el 7% de la población adulta cumple los criterios de la definición de abuso de alcohol según el DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición)<sup>30</sup>, lo que supone una prevalencia 5 veces mayor que la de la hepatitis C. En varias series de casos publicadas por autores europeos, la cirrosis alcohólica es causante de entre un tercio a la mitad de los casos de HCC<sup>31-34</sup>.

### 1.4 Hepatocarcinoma y trasplante hepático

El HCC es un tumor agresivo que se desarrolla sobre un hígado cirrótico, lo cual tiene implicaciones mayores para el pronóstico y el tratamiento. Aunque la base del tratamiento es la resección quirúrgica, la mayoría de los pacientes no son elegibles debido a la extensión del tumor o la disfunción hepática subyacente. El estadiaje preciso del tumor es esencial para el manejo apropiado de los pacientes con HCC. El sistema TNM (que hace referencia al tamaño del tumor primario –T–, a la afectación de ganglios linfáticos regionales o nodos linfáticos –N–, y la presencia de diseminación a distancia o metástasis –M–), utilizado en la mayoría de los tumores sólidos, es de poca utilidad en el proceso de toma de decisiones clínicas en el HCC, debido a que no tiene en cuenta el estado funcional hepático. El sistema de estadiaje más frecuentemente usado en la práctica clínica en nuestro medio es el BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer)<sup>35</sup>, que asocia además, la modalidad de tratamiento preferida para cada estadio (figura 2).



**Figura 2:** Sistema de estadiaje propuesto por BCLC (adaptado de: Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19:329<sup>35</sup> y actualizado según las guías europeas para el manejo del HCC<sup>36</sup>). HCC: hepatocarcinoma; PST: *performance status test*, test de estado funcional; PS: *performance status*, estado funcional; PEI: *percutaneous ethanol ablation*, ablación percutánea con alcohol; RF: radiofrecuencia; SV: supervivencia.

Los pacientes con HCC en estadios tempranos pueden beneficiarse de terapias curativas incluyendo resección quirúrgica, trasplante hepático y ablación percutánea, con tasas de supervivencia de 50-75% a los 5 años. La quimioembolización transarterial (*TACE*, *transarterial chemoembolization*) es el tratamiento de elección en pacientes con estadios intermedios. Para los pacientes en estadio C de Barcelona, el tratamiento estándar son los inhibidores multiquinasa, siendo el más empleado el sorafenib<sup>36,37</sup>.

El trasplante hepático es una opción adecuada para los pacientes con mala situación funcional hepática, que no tolerarían la resección, y que tienen un HCC solitario  $\leq 5$  cm de diámetro o hasta tres lesiones sin que ninguna supere los 3 cm (criterios de Milan)<sup>38</sup>, sin evidencia de invasión vascular, y sin metástasis ganglionares regionales o a distancia. El trasplante hepático ofrece un tratamiento curativo para las dos enfermedades que presentan estos pacientes: el HCC y la cirrosis. Los resultados del trasplante hepático para el tratamiento de HCC que cumplen los criterios de Milan son excelentes, con unas tasas de supervivencia libre de recidiva del 83 al 92% a los 3 años y hasta el 75% a los 5 años. En pacientes cuidadosamente seleccionados, la supervivencia a largo plazo es similar a la de los pacientes que reciben trasplante hepático por otras causas<sup>39-43</sup>. Una limitación importante del trasplante de órganos es la escasez de donantes, que condiciona largo tiempo en lista de espera. Este problema ha hecho necesario el desarrollo de un sistema de asignación por el que se da prioridad a los pacientes más gravemente enfermos. En nuestro entorno, la asignación de hígados para adultos se basa en un modelo estadístico para predecir la supervivencia en pacientes con cirrosis: el sistema MELD (*model for end-stage liver disease*, modelo de enfermedad hepática en estado terminal)<sup>44</sup>. El diagnóstico de HCC aumenta la puntuación de prioridad para los pacientes en lista de espera.



---

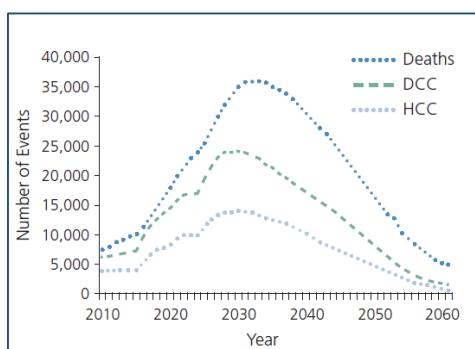
## 2. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

---

El virus de la hepatitis C es un virus ARN de cadena simple perteneciente a la familia Flaviviridae. Existen hasta 7 genotipos aislados en diferentes zonas geográficas, cada uno de los cuales se divide en subtipos identificados mediante letras<sup>45</sup>. El genotipo 1 es el más frecuente en todo el mundo, siendo el genotipo 1b el más frecuente en Europa. El genotipo 3 es el más frecuentemente encontrado entre los usuarios de drogas por vía parenteral, con un aumento en los últimos años del genotipo 4 en este colectivo. El ciclo celular del VHC ocurre en el citoplasma y, a diferencia del VHB, el material genético del VHC no se integra en el genoma celular durante su ciclo de replicación, lo que confiere enormes ventajas de cara al tratamiento, posibilitando la erradicación de la infección.

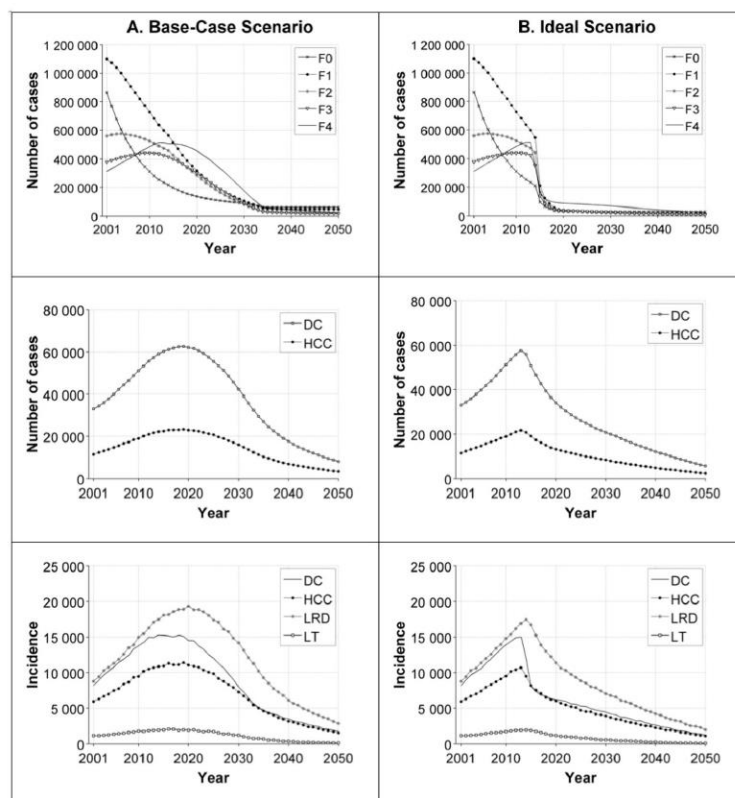
### 2.1 Epidemiología de la infección crónica por VHC

La enfermedad hepática crónica relacionada con VHC es una de las principales causas de cirrosis hepática y HCC en nuestro medio, así como la primera indicación actual de trasplante hepático. La prevalencia global de la infección por VHC se estima en torno al 3%, lo que representa alrededor de 170 millones de personas infectadas en el mundo<sup>46</sup>. La tasa de mortalidad ajustada a la edad en los pacientes con infección crónica por VHC es de 4,6/100.000 personas y año, mayor que la observada entre los individuos con infección crónica por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En Europa, la prevalencia del VHC varía entre el 2,4% para Europa occidental y central y 2,9% para Europa del Este<sup>46</sup>. Las predicciones para los próximos años no son más esperanzadoras: se estima que en el año 2020 los pacientes infectados por VHC que desarrollen cirrosis se incrementarán en un 30% en ausencia de tratamiento eficaz, duplicando su prevalencia actual, mientras que la incidencia de HCC aumentará en un 80%<sup>47-49</sup>. De esta manera, la prevalencia máxima de cirrosis descompensada, HCC y muerte asociados a enfermedad crónica por VHC se espera para la década de 2030, como se muestra en la figura 3<sup>49</sup>.



**Figura 3:** Pronóstico de la morbilidad relacionada con la infección por VHC en EE.UU. (tomado de: Rein DB, Wittenborn JS, Weinbaum CM, et al. Forecasting the morbidity and mortality associated with prevalent cases of pre-cirrhotic chronic hepatitis C in the United States. Dig Liver Dis. 2011;43:66<sup>49</sup>). DCC: cirrosis descompensada; HCC: hepatocarcinoma; Deaths: muertes.

En este contexto clínico, antes de la llegada de los nuevos fármacos antivirales directos, los pronósticos estimaban que las indicaciones de trasplante hepático por enfermedad relacionada con el VHC se duplicarían. Con la generalización del uso de estos fármacos, se espera una drástica reducción de los nuevos casos de cirrosis entre los infectados por VHC; sin embargo, respecto a la incidencia de casos de HCC, las predicciones no son tan optimistas. En un reciente trabajo<sup>50</sup> se ha evaluado el impacto de los nuevos tratamientos sobre la evolución de la enfermedad en los próximos años mediante un modelo que, considerando la prevalencia actual de la infección, predice la situación de las complicaciones futuras de la enfermedad en tres escenarios: 1) la evolución natural; 2) un escenario en el que la capacidad de tratamiento es limitada bien por infradiagnóstico o por incapacidad del sistema para asumir costes, similar a la práctica clínica habitual; y por último, 3) una situación ideal en la que el tratamiento con antivirales directos estuviera disponible de forma generalizada y se indicara en todos los pacientes infectados. Las predicciones de los dos últimos escenarios se muestran en la figura 4. Bajo el escenario que remeda la práctica clínica real, esta simulación matemática predice que la prevalencia de cirrosis descompensada y HCC, y por tanto, las muertes relacionadas con la enfermedad crónica por VHC y las indicaciones de trasplante hepático, continuará en aumento al menos hasta 2025.



**Figura 4:** Predicción de las complicaciones de la infección crónica por VHC en distintos escenarios teóricos. En la columna A se muestran las predicciones del escenario que simula la práctica clínica, y en la B las del escenario ideal (tomado de: Kabiri M, Jazwinski AB, Roberts MS, et al. The Changing Burden of Hepatitis C Infection in the United States: Model-based Predictions. *Ann Intern Med.* 2014; 161: 170<sup>50</sup>). DC: cirrosis descompensada. HCC: hepatocarcinoma. LRD: muertes de causa hepática. LT: trasplante hepático.

## 2.2 Evolución natural

La infección aguda por el VHC es habitualmente asintomática o cursa con clínica leve; sin embargo, la mayoría de los casos evoluciona a la cronicidad. La alta variabilidad del genoma del VHC, debido a la ausencia de actividad correctora de errores de la ARN polimerasa dependiente de ARN del VHC, proporciona al virus la capacidad de evadir la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Así, la infección crónica por VHC está producida por múltiples subtipos, con millones de genomas heterogéneos (llamados cuasiespecies) en constante cambio, debido a la selección continua de nuevas variantes que escapan a la presión de la respuesta inmune<sup>51</sup>.

Alrededor del 30% (15-50% según las series)<sup>52-55</sup> de los individuos que se infectan por VHC logran aclarar el virus de forma espontánea durante la infección aguda. Se han descrito como factores relacionados con el aclaramiento espontáneo de la infección el genotipo viral, el sexo femenino, la menor edad en el momento de la infección, la ausencia de cualquier situación que comprometa la inmunocompetencia del huésped, y el genotipo favorable en el polimorfismo de la interleuquina 28B (*IL28B*), que parece ser uno de los factores más influyentes.

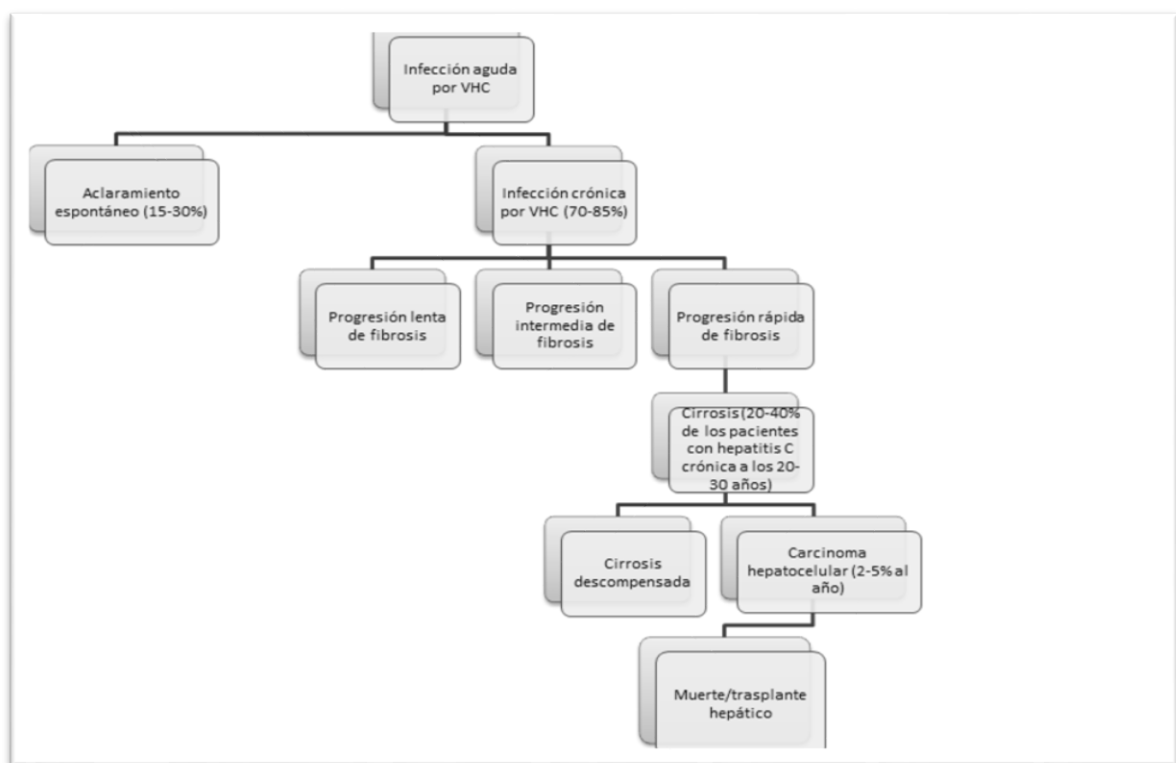
El curso natural de la infección crónica por VHC (figura 5) ha ofrecido históricamente problemas para su caracterización debido, principalmente, a su larga evolución. Una vez la infección por VHC cronifica, su evolución es muy lenta y en la mayor parte de los casos no llega a producir enfermedad hepática significativa; no obstante, entre un 20 y un 40% de los sujetos infectados desarrollan cirrosis hepática en un periodo variable de entre 20 y 30 años<sup>55-57</sup>. A pesar del bajo porcentaje de infectados que evoluciona a cirrosis, y de su larga evolución, la enfermedad hepática relacionada con VHC es la principal indicación de trasplante hepático en los países desarrollados.

Existen algunos factores tradicionalmente asociados con una mayor y más grave progresión de la enfermedad hepática por VHC<sup>55,58</sup>, a saber: sexo masculino, infección a edad superior a 40 años<sup>58</sup>, raza, infección por vía parenteral<sup>60</sup>, coinfección por VHB o VHD<sup>61-65</sup>, coexistencia de otras causas de daño hepático (consumo de alcohol<sup>66-68</sup>, presencia de síndrome metabólico<sup>69-72</sup>), coinfección por VIH<sup>73-75</sup> o cualquier situación de inmunocompromiso. Sin embargo, incluso en poblaciones homogéneas en las que se controlan todos los factores arriba expuestos, la evolución de la enfermedad no es uniforme entre los individuos infectados, lo que sugiere la influencia de otros elementos de probable origen genético.

El desarrollo de cirrosis, que ocurre en alrededor del 20-40% de los pacientes con infección crónica por VHC, ensombrece notoriamente el pronóstico. Así, mientras que los pacientes con hepatitis C crónica que presentan grados leves de fibrosis presentan una esperanza de vida con sólo un leve decremento respecto a la de la población

general, los pacientes con cirrosis VHC presentan un marcado descenso en la expectativa de vida a los 5 y 10 años<sup>76</sup>. Una vez establecida la cirrosis hepática, el riesgo de descompensación es de aproximadamente un 4% al año, similar al de pacientes con cirrosis de otras etiologías<sup>77</sup>. La cirrosis hepática descompensada condiciona un claro descenso de la supervivencia, presentando tasas de mortalidad de hasta un 10% anual tras la primera descompensación<sup>78</sup>. La probabilidad de supervivencia disminuye drásticamente hasta el 50% a los 5 años.

Comparado con la población no infectada, los sujetos con enfermedad crónica relacionada con el VHC presentan mayor probabilidad de muerte por causa hepática a edades más jóvenes; según registros estadounidenses, tres cuartas partes de las muertes relacionadas con esta enfermedad ocurren en pacientes de entre 45 y 65 años, lo que sitúa la infección crónica por VHC como una de las enfermedades causantes de más años potenciales de vida perdidos<sup>47</sup>. Una causa sustancial de trasplante hepático y mortalidad entre los pacientes con cirrosis por VHC es el desarrollo de HCC, que presenta una tasa estimada del 4% anual. El HCC asociado a la infección crónica por VHC se ha revisado ampliamente en otro apartado de esta introducción.



**Figura 5:** Diagrama que ilustra la evolución natural del VHC

---

### 3. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA INTERLEUQUINA 28B (*IL28B*)

---

En 2009, cuatro grupos independientes de investigadores identificaron dos polimorfismos de nucleótido único (SNP, *single nucleotide polymorphism*), rs12979860 C/T y rs8099917 C/T, asociados con el aclaramiento espontáneo de la infección por VHC<sup>79</sup> y a la respuesta al tratamiento con interferón (IFN)<sup>80-83</sup>, mediante el estudio de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome-wide association study*). Ambos polimorfismos, que se encuentran ligados, están situados cerca de la región del promotor del gen de la *IL28B*.

El polimorfismo de la *IL28B* predice la probabilidad de aclaramiento espontáneo tras la infección por hepatitis C, siendo del 53% en los pacientes con genotipo favorable (C/C) frente al 23,4% en los sujetos con genotipo desfavorable (T/T)<sup>79</sup>.

El tratamiento de la infección crónica por VHC y los recientes avances en este campo, que están generando una profunda transformación en la historia natural de esta enfermedad, es un tema extenso que escapa a los objetivos generales de esta tesis. Sin embargo, sí es necesario revisar en la introducción a este trabajo la influencia del polimorfismo en el gen de la *IL28B* en la respuesta al tratamiento clásico basado en IFN. La presencia de un genotipo favorable en el polimorfismo del gen de la *IL28B* se asocia a una probabilidad dos veces mayor de alcanzar una respuesta viral sostenida (RVS) tras tratamiento convencional con IFN y ribavirina<sup>80-83</sup>. Esta asociación se mantiene entre las distintas razas. La distribución geográfica de las frecuencias alélicas explicaría las diferencias geográficas y étnicas clásicamente observadas en la respuesta al tratamiento: la frecuencia del alelo C en el polimorfismo rs12979860 C/T es mayor en los individuos asiáticos, seguidos de los caucásicos e hispanos (55%), siendo mucho menos frecuente en la población afroamericana (25%)<sup>80-83</sup>.

Las diferencias interindividuales otorgadas por el polimorfismo de *IL28B* en la respuesta al tratamiento basado en interferón traducen diferencias en la capacidad de respuesta inmune contra la infección por VHC. Por tanto, estos polimorfismos podrían explicar, al menos en parte, las enormes diferencias observadas en la historia natural de la hepatitis C entre los individuos infectados. En efecto, los polimorfismos desfavorables en este gen se asocian a una mayor y más rápida progresión de la fibrosis en los pacientes con infección crónica por VHC<sup>84-87</sup>, lo cual se ha observado en distintos escenarios y ha sido confirmado en distintas poblaciones.

### 3.1 Interferon-lambda (IFN- $\lambda$ )

El gen de la *IL28B*, situado en el cromosoma 19, codifica para el IFN- $\lambda$ <sup>88</sup>. La familia de los interferones, que constituyen una de las primeras respuestas orquestadas por el sistema inmune innato en respuesta a la infección viral, se clasifica en tres subtipos distintos: tipo I, tipo II y tipo III, que disponen de vías de señalización y receptores específicos.

La familia de los IFN-I se compone de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$  e IFN- $\kappa$ , que comparten receptor específico; son capaces de inhibir directamente la replicación viral en células permisivas y ejercen, además, funciones inmunorreguladoras para coordinar la respuesta inmune adaptativa que sigue a la respuesta innata.

La familia de los IFN tipo II consta sólo de un miembro, el IFN- $\gamma$ , que es marcadamente diferente de la familia del IFN tipo I. El IFN- $\gamma$  juega un importante papel tanto en la inmunidad innata, al activar las células *natural killer* (NK) y los macrófagos, como en la inmunidad adaptativa, al ser el principal estímulo para la organización de la respuesta T citotóxica.

La familia de los IFN tipo III constituye el grupo más recientemente descrito<sup>89-90</sup>; en humanos, esta familia está compuesta de IFN- $\lambda$ 1 o *IL29*, el IFN- $\lambda$ 2 o *IL28A* y el IFN- $\lambda$ 3 o *IL28B*. El IFN-III pertenece a la superfamilia de la IL10, con la que comparte homología estructural y receptor. El receptor del IFN- $\lambda$  es un heterodímero compuesto por dos cadenas, la primera compartida con el receptor de la IL10 y de distribución universal en las células, y la segunda específica y restringida a algunos tipos celulares<sup>91-92</sup>. Sin embargo, funcionalmente está relacionado con los IFN tipo I, puesto que participa en la respuesta antiviral directa<sup>91</sup>. De hecho, la expresión de IFN-I y III es inducida por los mismos agentes y está regulada por un mecanismo común. Además, las vías de señalización intracelular activadas tras la unión de ambas familias de IFN con sus receptores celulares son esencialmente las mismas, fundamentalmente la vía JAK-STAT y la de las MAP kinasas.

#### 3.1.1 Actividad antiviral del IFN- $\lambda$

La primera línea de defensa contra la infección por cualquier patógeno está llevada a cabo por la respuesta inmune innata, basada en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*) mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *pattern recognition receptors*) codificados en línea germinal, que discriminan lo propio de lo extraño y de este modo inician la primera respuesta contra la infección. Además de ejercer una rápida actividad microbicida, el sistema inmune innato presenta un papel crucial para el desarrollo posterior de la respuesta inmune adaptativa.

El reconocimiento de los virus por PRR en las células infectadas estimula la expresión de genes que codifican proteínas con efecto antiviral, como los interferones  $\alpha$  y  $\lambda$ . Pese a las diferencias estructurales en los receptores de ambas familias de interferones, la cascada de señalización intracelular generada en respuesta a la activación de ambos es prácticamente idéntica, por lo que comparten actividad biológica.

En contraste con las similitudes funcionales entre los interferones  $\alpha$  y  $\lambda$ , existe un elemento que los diferencia sustancialmente: el nivel de expresión de su receptor en los diferentes tejidos. Mientras que el receptor del IFN- $\alpha$  es ubicuo, la expresión del receptor del IFN- $\lambda$  está restringida a unos pocos tipos celulares<sup>92</sup>, entre las que destacan las células epiteliales, por lo que la respuesta antiviral mediada por IFN- $\lambda$  es prácticamente exclusiva de los tejidos que contienen este tipo de células (piel y mucosas, tejido intestinal e hígado, y pulmón). La expresión preferencial del receptor de IFN- $\lambda$  en la superficie epitelial permite al huésped controlar de forma rápida la infección viral en las principales puertas de entrada al organismo antes de que la infección se establezca, y sin activar una respuesta inflamatoria sistémica.

En el caso concreto de la infección por VHC, se desencadena en el hepatocito una respuesta solapada mediante la expresión de interferones  $\alpha$  y  $\lambda$ <sup>93</sup> para el control de la infección, lo que constituye el mecanismo biológico que explicaría la asociación entre los polimorfismos situados cerca de la región del promotor del gen del IFN- $\lambda 3$  o *IL28B* y la evolución de la enfermedad.

### 3.1.2 Actividad antitumoral del IFN- $\lambda$

La actividad antiviral de los IFN-I está ampliamente demostrada. Actualmente, existe una fuerte evidencia de su importante papel en el control de la proliferación celular y la inmunovigilancia antitumoral<sup>94</sup>. La cascada de señalización intracelular que se desencadena en las células cuando se acopla el IFN-I con su receptor específico en la superficie celular es la responsable de constituir, mediante la inducción de la expresión de diferentes genes, el llamado estado antiviral en las células. Las mismas rutas de señalización están implicadas en las respuestas antiproliferativa y proapoptótica. La apoptosis mediada por IFN es, de hecho, uno de los mecanismos que conducen a la depleción de células infectadas durante la respuesta antiviral. En efecto, el IFN- $\alpha$  es empleado en la práctica clínica habitual para el tratamiento de varias enfermedades oncológicas como algunas leucemias y linfomas, hipernefoma, melanoma o sarcoma de Kaposi<sup>95-99</sup>.

Puesto que los mecanismos de señalización intracelular, y por tanto la actividad biológica, del IFN- $\alpha$  son esencialmente los mismos que los del IFN- $\lambda$ , es altamente probable que compartan también la función antitumoral. En este sentido, varios grupos

han demostrado *in vitro* el efecto antiproliferativo del IFN- $\lambda$  en modelos animales y humanos<sup>100-104</sup>.

La actividad antiproliferativa de los interferones comparte, presumiblemente, los mecanismos de activación empleados en la respuesta antiviral. La respuesta innata ante los virus se fundamenta en el reconocimiento de patrones moleculares por PRRs. Del mismo modo que las células infectadas por virus, las células tumorales, transformadas, exponen moléculas capaces de ser reconocidas por los PRR, lo que sitúa a estos receptores como punto fundamental en el estudio de la defensa inmunológica contra el cáncer.



---

## 4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS RECEPTORES TOLL-LIKE

---

Los receptores Toll-like (*TLRs*) son una familia de receptores altamente conservados a lo largo de la evolución, fundamentales en la activación de la respuesta inmune innata. A diferencia del sistema inmune adaptativo, que requiere tiempo para organizar su respuesta tras el contacto con el antígeno, las células de la respuesta inmune innata, primera línea de defensa contra la infección por microorganismos o la lesión por cualquier otro mecanismo, expresan de forma constitutiva receptores codificados en línea germinal no específicos de antígeno, los PRR, que se activan tras el reconocimiento de PAMPs<sup>105</sup>, elementos estructurales altamente conservados entre los microorganismos, como ácidos nucleicos de virus o componentes de la estructura bacteriana, lo que permite reconocer un gran número de potenciales patógenos mediante el uso de un número restringido de receptores.

Se han descrito varios tipos de PRRs, entre los que destacan los *TLRs*, descubiertos a finales del siglo XX como receptores esenciales en la defensa de la mosca de la fruta frente a la infección fúngica<sup>106</sup>. Posteriormente, fueron identificados receptores estructuralmente similares en mamíferos que se denominaron receptores Toll-like<sup>107</sup>. En humanos se conocen diez *TLRs* (TLR 1 -10), que se clasifican por su ligando específico y su localización en la célula (tabla 1)<sup>108</sup>. TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10 se localizan en la superficie celular, y reconocen componentes bacterianos como el lipopolisacárido o el peptidoglucano, o proteínas de la envuelta viral<sup>109</sup>. TLR2, además de reconocer diferentes componentes microbianos, forma heterodímeros con TLR1 y TLR6<sup>110</sup>, lo que funcionalmente parece traducirse en un aumento de los componentes microbianos que puede reconocer. TLR3, 7, 8 y 9 se localizan en membranas endosomales del compartimento intracelular, y reconocen material genético extraño al huésped, como el ADN no metilado de las bacterias o el ARN de cadena doble o sencilla de los virus<sup>109</sup>.

Tras el reconocimiento de PAMPs por los *TLRs*, se activa una cascada de señalización intracelular. La activación de cada TLR específico conduce a diferentes patrones de expresión génica, aunque todos ellos, excepto TLR3, comparten una vía común a través del adaptador MyD88 (myeloid differentiation factor 88), que finalmente activa factores de transcripción que promueven la expresión de mediadores inflamatorios, entre los cuales destacan citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$ . Sin embargo, TLR3, que reconoce estructuras virales, y otros *TLRs* endosomales activados por ligandos específicos, utilizan el adaptador TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), que induce la expresión de IFN tipo I y III, con una marcada actividad antiviral, como se ha revisado con anterioridad.

En el caso de la infección por VHC, TLR3 reconoce el ARN del VHC e induce la expresión de interferón I y III; la proteína del core y la proteína no estructural NS3/4A son reconocidas por TLR2, y la proteína NS5A es capaz de activar TLR4<sup>111</sup>. Los polimorfismos en los genes que codifican los diferentes TLRs podrían ser uno de los condicionantes genéticos de la diferente progresión de la fibrosis entre los individuos infectados por VHC.

**Tabla 1:** Ligandos endógenos y exógenos específicos de los distintos *TLRs*. [Adaptado de: Takeda K and Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol. 2005<sup>108</sup>].

TLR	Ligando exógeno	Ligando endógeno
TLR1	Triacil-lipopéptidos	
TLR2	Peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram+ (con TLR6) Lipoarabinomano de micobacterias diacil-lipopéptidos, triacil-lipopéptidos (con TLR1) fimbrias	Productos de degradación de la matriz extracelular. Proteínas reguladoras de la cromatina (HMGB1 <sup>1</sup> )
TLR3	ARN de doble cadena	
TLR4	Lipopolisacárido	Proteínas de choque térmico (HSP 60, HP 70) Fibronectina Ácido hialurónico Sulfato de heparina
TLR5	Flagelina	
TLR6	Diacil- lipopéptidos	
TLR7	ARN de cadena sencilla	
TLR8	ARN de cadena sencilla	
TLR9	CpG ADN	Ácidos nucleicos propios (en condiciones patológicas).
TLR10	Desconocido	

<sup>1</sup>HMGB1: *High mobility group box 1* (proteínas del grupo de alta movilidad, del grupo de las alarminas).

Además de componentes presentes en los microorganismos, los *TLRs* pueden reconocer moléculas derivadas de los tejidos lesionados del huésped. Se han identificado ligandos endógenos de *TLRs* (tabla 1), que son señales de peligro producto del daño celular o tisular de cualquier origen, y que guardan homología estructural con los PAMPs<sup>112</sup>. Se han denominado DAMPs (*damage-associated molecular pattern*, patrones moleculares asociados a daño), y son el principal estímulo para la respuesta innata a la lesión isquémica o tras traumatismos. Los principales DAMPs identificados son productos de degradación celular o de la matriz extracelular, reconocidos por los *TLRs* de superficie, y cromatina o complejos ribonucleoproteicos liberados por células necróticas, reconocidos por los *TLRs* intracelulares. En este sentido, se ha sugerido que los *TLRs*, a través del reconocimiento de DAMPs, presentan un papel importante en la inmunogénesis de las enfermedades autoinmunes y en la respuesta antitumoral<sup>113</sup>.

#### 4.1 Polimorfismos de *TLRs* y enfermedades infecciosas y autoinmunes

Los genes que codifican para los TLRs contienen gran cantidad de polimorfismos genéticos, algunos con una repercusión funcional importante. Como es sabido, nuestra configuración genética está profundamente modelada por la selección de aquellas variantes genéticas que durante la evolución han condicionado una ventaja competitiva. En este sentido, se han identificado varios polimorfismos genéticos en los genes que codifican para los diferentes TLRs, con una distribución geográfica y racial particular, que responde a la presencia del factor para el cual la variante otorga ventaja. El ejemplo mejor caracterizado es, quizá, un polimorfismo en *TLR4* que confiere resistencia natural contra la malaria, por lo que está ampliamente distribuido en África subsahariana; sin embargo, los portadores de dicho polimorfismo presentan una susceptibilidad especial a las infecciones graves por Gram negativos, encontrando, en consecuencia, una baja frecuencia del mismo en población caucásica<sup>114</sup>. El análisis de la distribución geográfica de este polimorfismo ejemplifica cómo la interacción entre el sistema inmune innato y la presión infecciosa presente en regiones específicas puede explicar las diferencias en la configuración genética de los individuos según su raza y procedencia geográfica.

Algunos polimorfismos genéticos de los *TLRs* se han relacionado con el desarrollo de determinadas enfermedades autoinmunes y con la susceptibilidad a distintas enfermedades infecciosas. Así, está bien documentada la relación de los polimorfismos en el gen de *TLR4* (receptor del lipopolisacárido -LPS-) con la probabilidad de desarrollar shock séptico en el contexto de la infección por bacilos Gram negativos<sup>115</sup>. Del mismo modo, los polimorfismos en el gen de *TLR2* se asocian con un aumento de susceptibilidad a la sepsis por Gram positivos, particularmente al shock séptico estafilocócico, y a la enfermedad tuberculosa<sup>116</sup>.

En el contexto de las enfermedades autoinmunes, se ha documentado la implicación de los polimorfismos en el gen de *TLR9*<sup>117</sup>. Este TLR reconoce regiones no metiladas del ADN bacteriano que lo diferencian del ADN propio. Sin embargo, no todo el material genético en humanos está metilado; los ácidos nucleicos propios, en condiciones normales, no activan la respuesta inmune innata porque se degradan antes de ser expuestos a los TLRs intracelulares. En este sentido, el reconocimiento inapropiado de material genético propio no metilado conduciría al desarrollo de autoinmunidad.

## *4.2 Polimorfismos de TLRs y cáncer*

El cáncer es una enfermedad con una base genética importante que se produce como consecuencia de la acumulación de mutaciones en las células tumorales, que les permite escapar a los mecanismos de control de la proliferación celular a los que están sometidas las células sanas. La respuesta inflamatoria es, muchas veces, capaz de eliminar las células tumorales, aunque en otros casos no es suficiente para eliminar el tumor, produciéndose una inflamación crónica. Como resultado se expone un gran número de DAMPs, producto de la muerte no programada de parte de las células tumorales, que son reconocidos por los PRR<sup>113</sup>.

Es bien conocida la relación entre la inflamación crónica y el desarrollo de cáncer, cuyo ejemplo más ilustrativo es precisamente el HCC. Puesto que los TLRs son moléculas íntimamente relacionadas con la iniciación y el mantenimiento del proceso inflamatorio, los polimorfismos genéticos de dichos receptores podrían jugar un papel decisivo en la tumorogénesis del HCC. La evidencia científica disponible en este sentido es muy escasa.

Estudios recientes han analizado el papel de los TLRs en diferentes tumores humanos, incluyendo el cáncer de próstata, colon, pulmón, mama, ovario y varios tumores hematológicos<sup>118-121</sup>. La función de los TLRs en la dinámica tumoral no se conoce por completo, y la evidencia arrojada por los diferentes estudios es contradictoria<sup>122</sup>. En algunos trabajos se sugiere que podrían estar implicados en el crecimiento tumoral, la progresión local y la capacidad metastásica, mientras que otros investigadores han encontrado un papel protector de los TLRs, cuya activación promovería la apoptosis de las células tumorales. Son necesarios más estudios que intenten aclarar las distintas vías de señalización intracelular de los TLRs y su compleja relación con el microambiente tumoral para una mejor comprensión de su implicación tanto en la respuesta inmune antitumoral como en la biología tumoral.

---

## 5. HEPATOCARCINOMA Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN COMPONENTES DE LA INMUNIDAD NATURAL

---

El HCC de cualquier origen es una importante causa de muerte entre los pacientes con cirrosis hepática, y una indicación creciente de trasplante hepático. Las guías de práctica clínica recomiendan la realización de estrategias de despistaje y diagnóstico precoz de HCC en pacientes de alto riesgo, esto es, en pacientes cirróticos de cualquier etiología, que se han demostrado eficaces en la detección de HCC temprano. Sin embargo, la biología tumoral del HCC temprano no se conoce en profundidad, y los patrones de crecimiento tumoral pueden variar sustancialmente entre los individuos, sugiriendo un sustrato genético. Recientemente se ha publicado un metaanálisis evaluando la eficacia de los programas de cribado actuales<sup>123</sup> que sugiere que los pacientes con HCC inicial de curso indolente serían seleccionados durante su espera en lista de trasplante, mientras que los pacientes con una enfermedad más agresiva saldrían de la lista por progresión antes de ser trasplantados.

Así las cosas, los esfuerzos deben centrarse en la identificación de factores que permitan seleccionar a los pacientes que presenten un riesgo mayor de desarrollar la enfermedad, por una parte, y predecir el comportamiento del HCC por otra.

Puesto que los polimorfismos de la *IL28B* han demostrado una fuerte asociación con el aclaramiento espontáneo e inducido por IFN de la infección por VHC, y con la evolución de la enfermedad, es posible que dichos polimorfismos tengan alguna implicación también en el desarrollo de HCC asociado a VHC, y fueran parte de los determinantes genéticos de la enfermedad. Por otra parte, se han atribuido al IFN- $\lambda$ , producto de la *IL28B*, funciones en el control la proliferación celular y la apoptosis, por lo que estos polimorfismos podrían asociarse con el desarrollo de HCC de cualquier etiología.

Asimismo, dado que los polimorfismos de los *TLRs* están directamente relacionados con la modulación de la respuesta innata a la infección viral, con la inducción de la expresión de IFN $\lambda$  y con la inmunovigilancia tumoral, estos podrían estar también implicados en el desarrollo de HCC y su progresión.

---

## 2. HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

---

## 1. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

---

La enfermedad hepática crónica relacionada con la infección por VHC es una de las principales causas de cirrosis hepática y HCC, y la primera causa de trasplante hepático en nuestro medio. Se han identificado dos SNPs (rs12979860 C/T y rs8099917 C/T, en desequilibrio de ligamiento) cerca del promotor del gen de la *IL28B* (gen de IFN- $\lambda$ ), que se asocian con el aclaramiento espontáneo de la infección por el VHC y predicen la respuesta al tratamiento basado en interferón.

Puesto que los polimorfismos de la *IL28B* se asocian con la velocidad de progresión de la fibrosis en la enfermedad hepática relacionada con el VHC, y el HCC es una consecuencia de la enfermedad hepática terminal, las variaciones genéticas en el polimorfismo rs12979860 (C/T) de la *IL28B* podrían estar asociadas con el desarrollo de HCC inducido por VHC.

Además, dado que el IFN  $\lambda$  también se ha implicado en la respuesta antitumoral, podría desempeñar un papel en el desarrollo de HCC de forma independiente a su participación en la respuesta contra el VHC; por tanto, las variaciones genéticas de la *IL28B* se relacionarían con el desarrollo de HCC de cualquier etiología.

La respuesta innata antiviral y antitumoral, mediada por IFN, se produce como resultado del reconocimiento de señales de daño por receptores específicos, entre los que destacan los TLRs. Se han descrito varios polimorfismos en los genes de los TLRs, que modulan su expresión y función, y que se han demostrado implicados en la susceptibilidad individual a enfermedades infecciosas, autoinmunes y tumorales. Por tanto, sugerimos que las variaciones genéticas en los polimorfismos de los *TLRs* podrían estar relacionadas con el desarrollo de HCC tanto en los pacientes infectados por VHC como en pacientes cirróticos de otra etiología.

El HCC muestra diferencias sustanciales en su comportamiento biológico, sin que existan por el momento herramientas clínicas que permitan predecir su evolución. El hallazgo de predictores genéticos con valor pronóstico demostrado sería de gran utilidad en el manejo clínico de los pacientes con HCC.

En resumen, la hipótesis de este trabajo es que los polimorfismos de *IL28B* y de *TLRs* se asocian con el desarrollo y la evolución del HCC.

---

## 2. OBJETIVOS

---

### *2.1 Objetivo principal*

El objetivo principal de este estudio es evaluar la asociación de los polimorfismos genéticos de la *IL28B* y de los *TLRs* con el desarrollo de HCC y su evolución postrasplante, tanto en pacientes con cirrosis por VHC como en pacientes cirróticos de otras etiologías.

### *2.2 Objetivos secundarios*

- Describir la distribución genotípica del polimorfismo rs12979860 (C/T) de *IL28B* y de los polimorfismos de *TLRs* en los pacientes con enfermedad hepática terminal inducida por los diferentes genotipos de VHC y por alcohol, y analizar las diferencias entre ellos.
- Estudiar la precisión de las técnicas de imagen empleadas de rutina en la valoración clínica pretrasplante para la caracterización de los HCC.
- Analizar la asociación de variables demográficas y clínicas con el desarrollo de HCC en pacientes con cirrosis por VHC y cirrosis alcohólica.
- Analizar, en los pacientes trasplantados con HCC, la asociación de las características clínicas, los datos anatomopatológicos y los polimorfismos genéticos estudiados con el riesgo de recidiva de HCC tras el trasplante hepático en las distintas poblaciones del estudio.
- Analizar el impacto de diferentes variables demográficas y clínicas, de los datos anatomopatológicos del explante, y de los polimorfismos genéticos estudiados en la supervivencia de los pacientes con HCC que reciben trasplante hepático.



---

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### ÍNDICE DE MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño y población del estudio	31
2. Definiciones y variables analizadas	33
2.1 Variable principal	33
2.2 Otras variables	33
3. Análisis de los polimorfismos	35
3.1 Selección de los polimorfismos	35
3.2 Procedencia de las muestras de ADN	35
3.3 Análisis de los polimorfismos	35
4. Análisis estadístico	37
5. Aspectos éticos	39

---

---

# 1. DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO

---

Estudio observacional retrospectivo, diseñado para analizar los factores de riesgo de HCC en pacientes cirróticos adultos, de raza caucásica, que recibieron un primer trasplante hepático de donante cadáver en el Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (HUPHM) entre enero de 1988 y diciembre de 2013 por cirrosis VHC o por cirrosis alcohólica.

Se eligió la cohorte de pacientes que recibieron trasplante hepático para seleccionar a los pacientes con las formas más graves de hepatopatía crónica y para asegurar el diagnóstico de cirrosis y HCC tras el análisis histológico del explante.

El grupo de pacientes con cirrosis alcohólica se eligió para el análisis de la asociación de los polimorfismos de *IL28B* y de los *TLRs* con el desarrollo de HCC, independientemente de su influencia en el curso de la infección por VHC.

Se excluyeron los pacientes de raza no caucásica con el objetivo de aumentar la consistencia y validez de los resultados.

El diagnóstico de la infección por el VHC se basó en la determinación de anticuerpos anti-VHC y fue confirmado mediante la detección del material genético del VHC utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desde que estuvo disponible en nuestro centro. La enfermedad hepática por alcohol fue diagnosticada por criterios clínicos, epidemiológicos e histológicos.

Los criterios de exclusión, comunes a las dos cohortes, fueron los siguientes:

- Coinfección VIH: acelera la progresión a fibrosis y aumenta el riesgo de HCC<sup>73-75</sup>.
- Coinfección VHB: aumenta el riesgo de HCC<sup>124-127</sup>.
- Trasplante previo de órgano sólido, o cualquier condición que requiera tratamiento inmunosupresor: altera la respuesta antiviral y antitumoral.
- Raza no caucásica
- Muestra de sangre para la extracción de ADN y análisis de los polimorfismos no disponible.

---

## 2. DEFINICIONES Y VARIABLES ANALIZADAS

---

### *2.1 Variable principal*

Se registró la presencia de HCC confirmado mediante el análisis histológico del explante en todos los pacientes del estudio. En los pacientes con HCC, se registró el tamaño y número de las lesiones tumorales (pT) y la presencia de invasión linfovascular. Se consideró que el paciente presentaba HCC en los casos en los que se evidenció éste en el análisis histológico, independientemente del diagnóstico del paciente antes del trasplante.

### *2.2 Otras variables*

Los datos demográficos básicos (fecha de nacimiento, sexo, raza), y los datos clínicos pretrasplante (presencia de diabetes mellitus, y estadio Child-Turcotte-Pugh) se obtuvieron de la revisión de las historias clínicas de los pacientes y del banco de datos del registro de trasplante hepático de la Unidad de Trasplante Hepático. La puntuación MELD no ha sido recogida por no estar disponible en los pacientes que recibieron el trasplante hepático antes de que estuviera disponible en la práctica clínica de rutina la determinación de INR.

En la cohorte de pacientes con cirrosis VHC, se registró el genotipo del VHC en los casos en que estuvo disponible, y la presencia de viremia en el momento del trasplante.

En los pacientes que recibieron trasplante por HCC, se recogió la adecuación a los criterios de Milan pretrasplante (tamaño y número de nódulos diagnosticados por las pruebas de imagen indicadas por los médicos responsables de los pacientes) desde la fecha en la que se aplican dichos criterios en nuestro centro, así como el tratamiento para el mismo durante su estancia en lista de espera si lo recibieron.

#### Criterios de Milan<sup>38</sup>:

- Nódulo tumoral único menor de 5 cm
- Hasta 3 lesiones tumorales menores de 3 cm
- Sin invasión vascular ni evidencia de diseminación a distancia

Para el análisis de la concordancia entre las características anatomopatológicas de los HCC tras el análisis de explante y los criterios de Milan, se clasificó a los pacientes en dos grupos:

- Pacientes cuyo tumor cumple los criterios de Milan tras el estudio del explante.
- Pacientes cuyo tumor no cumple los criterios de Milan por cualquier causa; en este segundo grupo, se diferenciaron los pacientes en función del motivo por el que excedían los criterios de Milan:
  - Pacientes que exceden los criterios de Milan por tamaño: HCC único mayor de 5cm, o bien 2 o 3 nódulos tumorales, midiendo alguno más de 3 cm.
  - Pacientes que exceden los criterios de Milan por multicentricidad: se incluyen en este grupo todos los pacientes en los que se detectó en el análisis anatomopatológico del explante la presencia de 4 nódulos tumorales o más, independientemente del tamaño de los mismos.

Para el análisis de la evolución postrasplante se revisaron las historias clínicas, y se recogieron los siguientes datos:

- Recidiva del HCC, en los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC, diagnosticada por los métodos elegidos según el criterio de los médicos responsables del paciente. Se excluyeron de este análisis los pacientes con seguimiento menor de 6 meses.
- Desarrollo de HCC de novo en el injerto en el caso de los pacientes trasplantados por cirrosis sin HCC.
- Supervivencia en aquellos pacientes en los que se disponía de un seguimiento de al menos 6 meses tras el trasplante. Los datos de supervivencia de los pacientes se censuraron a fecha de 30/06/2014, recogiendo la fecha de última visita, o antes en el caso de éxitus, retrasplante o pérdida de seguimiento. En los casos de éxitus y retrasplante, se registraron la causa y la fecha de los mismos.

---

## 3. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS

---

### 3.1 Selección de los polimorfismos

Se han analizado el SNP rs12979860 (C/T) de *IL28B* y seis polimorfismos de cinco *TLRs* (tabla 2). Estos polimorfismos se han seleccionado por tener una implicación fenotípica y/o por haberse encontrado asociados con la infección por VHC o con diferentes neoplasias. Todos los polimorfismos se encuentran representados en al menos un 5% de la población europea según la base de datos de SNPs del Instituto Nacional de la Salud de Norte América<sup>128</sup>.

Tabla 2: Polimorfismos analizados

	Cromosoma	Cambio de nucleótido	Cambio en la proteína	rs
<b>IL28B</b>	19q13.2	g.1825 G>A	No (cerca del promotor)	12979860
<b>TLR2</b>	4q31.3	c.2258 G>A	Arg753Gln	5743708
<b>TLR3</b>	4q35	c.1234 C>T	Leu412Phe	3775291
<b>TLR4</b>	9q32-33	c. 896 A>G	Asp299Gly	4986790
<b>TLR7</b>	Xp22.3	c.32 A>T	Gln11Leu	179008
<b>TLR8</b>	Xp22.3	c.1 A>G	Met1Val	3764880
<b>TLR9</b>	3p21.3	-1237 T>C	No (promotor)	5743836
		-1486 T>C	No (promotor)	187084

### 3.2 Procedencia de las muestras de ADN

Las muestras de ADN empleadas proceden de colecciones archivadas en el Biobanco del HUPHM y preservadas a -80°C. A los pacientes incluidos en el estudio de los que no se disponía de muestra de ADN, y que permanecían en seguimiento en nuestro centro, se les extrajo una muestra de sangre periférica, previo consentimiento informado, para el aislamiento de ADN genómico mediante el uso de productos comerciales, según las instrucciones del fabricante (*"DNA isolation kit for mammalian blood"*. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

### 3.3 Análisis de los polimorfismos

El análisis de los polimorfismos se realizó mediante PCR a tiempo real y análisis de las temperaturas de fusión con sondas específicas para cada uno de ellos (Light Mix, TIB MOLBIOL, GmbH, Berlín, Alemania) en el sistema Light Cycler 480 (Roche Diagnostics).

La amplificación se realizó en un volumen total de 20 µl que contenía 25 ng de ADN, 1x de *genotyping Master Mix* (Roche Diagnostics) y 1 µl de una mezcla de cebadores y sondas (Light Mix). Las condiciones de amplificación especificadas por el fabricante consistían en 10 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, seguidos de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C, y por último un ciclo de fusión que consistía en 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 2 minutos a 40°C y aumento gradual de la temperatura hasta 75°C.

La asignación alélica de cada individuo se realizó mediante el análisis de las curvas de fusión características para cada uno de ellos.

---

## 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

---

Las variables cuantitativas se expresan como media ( $\bar{x}$ ) y desviación estándar (DE) o mediana (me) y rango, mientras que para la descripción de las variables cualitativas se emplearon medidas de frecuencia en número de casos y porcentaje (%).

Se comprobó que las frecuencias genotípicas de los polimorfismos analizados eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de  $X^2$  con la calculadora online “Simple Hardy-Weinberg calculator-Court lab” (Universidad de Tufts, Boston, MA)<sup>129</sup>.

Se realizó un análisis univariante para estudiar la asociación de las variables demográficas, clínicas y de los distintos polimorfismos estudiados con la presencia de HCC y la recidiva del mismo postrasplante, tanto en los pacientes con infección crónica por VHC como con enfermedad hepática inducida por alcohol. Asimismo, se realizó un estudio comparativo de las distribuciones genotípicas entre ambas cohortes.

La asociación de las variables cuantitativas con la variable resultado se estudió mediante la prueba T de Student. Para estudiar la asociación de las variables cualitativas con la variable resultado, se empleó la prueba  $X^2$  de Pearson para tablas de contingencia 2x3, y se aplicó la corrección de continuidad de Yates o la prueba exacta de Fisher de dos colas para tablas de contingencia 2x2. La fuerza de la asociación de las variables estadísticamente significativas se estimó mediante el uso de *odds ratio* (OR) y los límites exactos de los intervalos de confianza (IC) del 95%.

Posteriormente, se realizó un estudio multivariante incluyendo las variables que habían mostrado asociación con la recidiva de HCC con una  $p < 0.1$  mediante un modelo de regresión logística.

Para el análisis de la supervivencia actuarial, se realizaron las funciones de supervivencia de Kaplan-Meier, y se compararon las curvas de supervivencia en función de las distribuciones genotípicas, la presencia de recidiva del HCC y otras variables clínicas y anatomopatológicas del explante. La comparación de las curvas se realizó mediante la prueba estadística Log-Rank. El tiempo hasta la recidiva se analizó, asimismo, mediante las funciones de supervivencia de Kaplan-Meier.

En todos los contrastes se rechazó la hipótesis nula con un error alfa de 0,05 ( $p < 0,05$ )

Todos los estudios estadísticos se realizaron utilizando el programa informático SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

---

## 5. ASPECTOS ÉTICOS

---

Este estudio no supuso riesgo alguno para la salud de los pacientes participantes en él. No se llevó a cabo durante el mismo ninguna intervención, ni produjo en forma alguna, por su naturaleza retrospectiva, modificación de la práctica clínica de sus médicos responsables, que fueron distintos del investigador. Se preservó en todo momento la confidencialidad de los datos mediante el tratamiento agregado de los mismos y la codificación de los nombres a través de combinaciones numéricas distintas del número de historia clínica.

El trabajo fue presentado al Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HUPHM, que dictaminó su aprobación (acta nº 264, 23 de marzo de 2011, y enmienda en acta nº 267, 27 de junio de 2011).

Todos los pacientes sometidos a trasplante hepático en nuestro centro, firman un consentimiento informado que incluye un apartado en el que se autoriza al grupo al uso de datos clínicos con fines investigadores.

Respecto al análisis de los polimorfismos en muestras de sangre de los pacientes, el CEIC del HUPHM dictaminó su permiso para la utilización de muestras archivadas en el Biobanco del HUPHM (acta nº 0030), con fecha 9 de marzo de 2015. En aquellos pacientes de los que no se dispuso de muestra en el Biobanco, se procedió a la extracción de sangre periférica, previa firma de consentimiento informado.



---

## 4. RESULTADOS

---

### INDICE DE RESULTADOS

9. Proceso de selección de los pacientes	43
10. Características de los pacientes	45
2.1 Variables demográficas	45
2.2 Variables clínicas	45
2.3 Variables relacionadas con el virus en los pacientes con infección por VHC	46
11. Estudio de los casos de hepatocarcinoma	47
3.3 Estudio comparativo de los pacientes con HCC asociado a VHC o a alcohol	47
3.4 Estudio anatomopatológico de los hepatocarcinomas	48
12. Características demográficas y clínicas relacionadas con el desarrollo de hepatocarcinoma	51
4.1 Enfermedad relacionada con VHC	51
4.2 Cirrosis enólica	52
13. Polimorfismos de <i>IL28B</i> y <i>TLRs</i>	55
5.3 Estudio comparativo de la distribución genotípica de los polimorfismos de <i>IL28B</i> y de <i>TLRs</i> entre los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica	55
5.4 Implicación de los polimorfismos de <i>IL28B</i> y de <i>TLRs</i> en el desarrollo de HCC	59
14. Recidiva de HCC postrasplante	63
6.2 Factores relacionados con la recidiva del HCC	65
15. Estudio de la supervivencia	71
7.4 Supervivencia global	71
7.5 Influencia del HCC en la supervivencia	72
7.6 Factores relacionados con la supervivencia en pacientes con HCC	73
16. Resumen de resultados	85
8.1 Estudio comparativo de los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica	85
8.2 Hepatocarcinoma	86
8.3 Estudio de la supervivencia	87

---

## 1. PROCESO DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

---

El flujo de selección de los pacientes incluidos en el estudio se resume en la Figura 6.

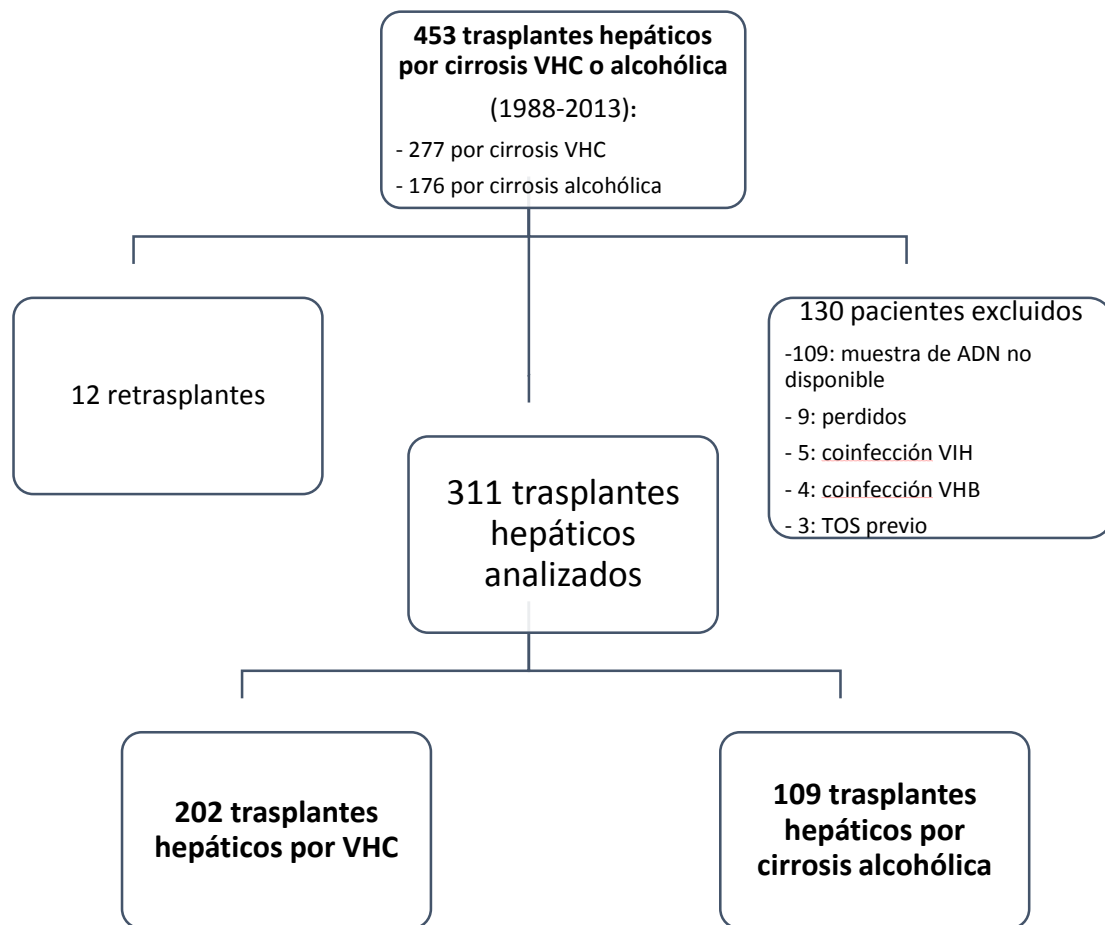
Durante el período estudiado se realizaron en nuestro centro 277 trasplantes hepáticos de donante cadáver a 265 pacientes adultos con enfermedad relacionada con VHC. Se excluyeron 12 pacientes que recibieron un retrasplante y otros 63 pacientes por los siguientes motivos:

- En 46 pacientes no fue posible la obtención de muestra de sangre para el estudio de los polimorfismos.
- Cuatro pacientes por estar coinfectados con el VHB. Uno de ellos, presentaba además coinfección por virus de hepatitis delta.
- Cinco pacientes por estar coinfectados con el VIH.
- Tres pacientes por estar bajo tratamiento inmunosupresor por trasplante previo de órgano sólido (dos trasplantes renales y uno cardíaco).
- En 5 pacientes no hubo datos suficientes para realizar el estudio.

Un total de 176 pacientes recibieron un primer trasplante hepático de donante cadáver por enfermedad hepática relacionada con alcohol. Tras aplicar los criterios de exclusión, 109 de ellos se incluyeron finalmente en el estudio. Los restantes 67 pacientes excluidos, lo fueron por:

- En 63 pacientes no fue posible la obtención de muestra de sangre para la realización del análisis de los polimorfismos.
- En 4 pacientes no estuvieron disponibles los datos clínicos necesarios para realizar el estudio.

Por tanto, el estudio incluye una población total de 311 pacientes (68.6% del total de los trasplantes realizados por las indicaciones estudiadas) que recibieron un trasplante hepático por cirrosis VHC (n=202) o alcohólica (n=109) durante el periodo de tiempo establecido.



**Figura 6:** Diagrama de flujo de la selección de pacientes incluidos en el estudio.

VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; TOS: trasplante de órgano sólido.

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

### 2.1 Variables demográficas

Las variables demográficas de la población analizada se resumen en la tabla 3. Los pacientes con cirrosis VHC presentaron mayor edad al trasplante ( $54,4 \pm 8.8$  años) que los pacientes con cirrosis alcohólica ( $51,7 \pm 9$  años;  $p=0,01$ ). Se observó una mayor frecuencia de varones en la cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica ( $OR= 5,33$ ; IC 95% 2,44-11,64;  $p<0,001$ ).

Tabla 3: Características demográficas de la población analizada.

	Cirrosis VHC (n=202)	Cirrosis alcohólica (n=109)	p
Edad, años [X±DE]	54,4 ± 8,8	51,7 ± 9	0,01 <sup>1</sup>
Sexo masculino [n (%)]	142 (70,3%)	101 (92,7%)	<0,001 <sup>2</sup>

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1) o de Chi cuadrado con la corrección de Yates (2).

### 2.2 Variables clínicas

Los datos clínicos de los pacientes estudiados se resumen en la tabla 4, siendo similares en la cohorte de pacientes con cirrosis por VHC y la de pacientes con cirrosis alcohólica.

Tabla 4: Características clínicas de la población analizada.

	Cirrosis VHC (n=202)	Cirrosis alcohólica (n=109)	p
Diabetes mellitus [n (%)]	40 (19,8%)	17 (15,6%)	0,84 <sup>1</sup>
Child-Turcotte-Pugh * [X±DE]	8,7 ± 1,8	8,9 ± 1,8	0,29 <sup>2</sup>
Estadío Child-Turcotte-Pugh* [n (%)]			
A	21 (11,5%)	8 (11,8%)	0,12 <sup>3</sup>
B	105 (57,7%)	30 (44,1%)	
C	56 (30,8%)	30 (44,1%)	

\* dato disponible en 182 (90.1%) pacientes infectados por VHC y 68 (62.4%) pacientes con cirrosis alcohólica.

Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado con la corrección de Yates (1), de T de student (2), o de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (3) .

### 2.3 Variables relacionadas con el virus en los pacientes con infección por VHC

El genotipo del VHC estuvo disponible en 175 (86,6%) pacientes con trasplante hepático por VHC. El más frecuente en nuestra población fue el genotipo 1 (n=155, 88,6%). De estos, 136 (87,7%) correspondían a genotipo 1b, 15 (9,7%) a genotipo 1a y en 4 pacientes (2,6%) no se especificó el subtipo. Entre los pacientes con genotipo no-1, el más frecuente fue el genotipo 3 (n=15, 8,6%), seguido del genotipo 2 (n=4, 2,3%). Hubo un caso de infección por genotipo 4.

La mayoría de los pacientes (95,1%) fueron trasplantados con viremia VHC. Los 10 pacientes restantes (4,9%) se trasplantaron sin carga viral detectable, bien por respuesta viral sostenida al tratamiento antiviral con persistencia de la indicación de trasplante hepático (n=7), o por estar bajo tratamiento antiviral en el momento del trasplante (n=3).

Al comparar las características de los pacientes con cirrosis por VHC en función del genotipo, se observó que los pacientes infectados por genotipos no-1 del VHC eran más jóvenes que los infectados por genotipo 1 ( $p=0,02$ ). No se encontraron diferencias en el resto de las variables demográficas y clínicas analizadas (tabla 5).

Tabla 5: Características de los pacientes infectados por VHC en función del genotipo viral.

	VHC Genotipo 1* (n=155)	VHC Genotipo no-1* (n=20)	p
Edad, años [X±DE]	55,1±8.6	50,3±8,5	<b>0,02<sup>1</sup></b>
Sexo masculino [n (%)]	110 (71%)	15 (75%)	0,91 <sup>2</sup>
Diabetes mellitus [n (%)]	28 (18,1%)	2 (10%)	0,53 <sup>2</sup>
Child-Turcotte-Pugh** [X±DE]	8,5±1,9	8,7±2	0,75 <sup>1</sup>
Estadío Child-Turcotte-Pugh** [n (%)]			
A	18 (12,5%)	2 (12,5%)	0,99 <sup>3</sup>
B	88 (61,1%)	10 (62,5%)	
C	38 (26,4%)	4 (25%)	

\*dato disponible en 175 pacientes

\*\*dato disponible en 144 pacientes con genotipo 1 y en 16 con genotipo no 1.

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1), de Chi cuadrado con la corrección de Yates (2), o de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (3).

### 3. ESTUDIO DE LOS CASOS DE HEPATOCARCINOMA

La incidencia de HCC fue mayor en los pacientes con cirrosis por VHC (n=79, 39.1%) que en los pacientes con cirrosis alcohólica (n=21, 19,3%) [OR= 2,7; IC 95% 1,5-4,7; p=0,001].

En el subgrupo de pacientes con HCC sobre cirrosis VHC, el genotipo viral estuvo disponible en el 93,7% de los pacientes (n=74). La mayoría de ellos (87,8%, n=65) estaban infectados por el genotipo 1 del VHC, predominando de nuevo el subtipo 1b. La incidencia de HCC fue similar en los pacientes con cirrosis por VHC genotipo 1 (n=65, 41.9%) y los pacientes con cirrosis VHC infectados por genotipos no-1 (n=9, 45%), (p=0,98).

#### 3.1 Estudio comparativo de los pacientes con HCC asociado a VHC o a alcohol

Se realizó un análisis comparativo de los datos demográficos y clínicos entre los pacientes con HCC asociado a infección por VHC y los pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica, según se resume en la tabla 6. Todos los pacientes (100%) con HCC sobre cirrosis alcohólica eran varones, mientras que en los pacientes con HCC asociado a VHC la proporción de varones era del 78,5% (n=62) [OR= 1,34; IC 95% 1,1-1,5; p=0,02]. Ambos grupos fueron comparables en el resto de variables analizadas.

Tabla 6: Estudio comparativo de los pacientes con HCC asociado a VHC y a alcohol.

	HCC- VHC (n=79)	HCC - alcohol (n=21)	p
Edad, años [X±DE]	56,4 ± 7,9	55,5 ± 7,9	0,64 <sup>1</sup>
Sexo masculino [n (%)]	62 (78,5%)	21 (100%)	<b>0,02<sup>2</sup></b>
Diabetes mellitus [n (%)]	16 (20,3%)	4 (19%)	1 <sup>2</sup>
Child-Turcotte-Pugh* [X±DE]	7,7 ± 1.8	7,2 ± 2	0,38 <sup>1</sup>
Estadío Child-Turcotte-Pugh * [n (%)]			
A	19 (28,4%)	7 (53,8%)	0,15 <sup>3</sup>
B	39 (58,2%)	4 (30,8%)	
C	9 (13,4%)	2 (15,4%)	

\* dato disponible en 67 pacientes con HCC asociado a VHC y en 13 paciente con HCC asociado a alcohol.

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1), de Chi cuadrado con el test exacto de Fisher de dos colas (2), o de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (3) .

### 3.2 Estudio anatomopatológico de los HCC

Se recogieron las características anatomopatológicas de los HCC tras el análisis del explante, y se analizó la concordancia entre el estudio pretrasplante mediante técnicas de imagen y el estudio histológico respecto a los criterios de Milan. Los criterios de Milan se aplican en nuestro centro desde 1997. Todos los HCC tratados mediante trasplante hepático con posterioridad a esa fecha cumplían los criterios de Milan pretrasplante utilizando las técnicas de imagen habituales en la práctica clínica.

#### 3.2.1 Pacientes con HCC asociado a enfermedad crónica por VHC

Durante el período comprendido entre 1997 y 2013 se realizaron 70 trasplantes hepáticos por HCC sobre cirrosis VHC en nuestro centro. El resto (n= 9), se excluyeron de este análisis, que tiene como objeto analizar la precisión de las técnicas de imagen en la caracterización pretrasplante de los HCC, por haberse realizado el trasplante antes de dicha fecha.

Todos cumplían los criterios de Milán en el estudio pretrasplante, utilizando las técnicas de imagen habituales en la práctica clínica. Sin embargo, tras el estudio anatomopatológico del explante, 28 pacientes (41,8%) excedían los criterios de Milán. En 3 pacientes no se pudo evaluar la concordancia porque el HCC presentaba necrosis de toda su extensión tras recibir tratamiento en lista de espera. Los datos se muestran en la tabla 7.

En 3 (9,4%) de los 32 pacientes que presentaban un nódulo tumoral único, éste medía más de 5 cm en el estudio del explante (media de tamaño 6,5 cm de diámetro mayor). De los 35 pacientes con 2 o 3 nódulos tumorales menores de 3 cm, sólo 10 (28,6%) cumplían los criterios de Milan. El resto (n=25, 71,4%) los excedieron: 12 (34,3%) presentaron al menos una lesión mayor de 3cm (media de tamaño de la lesión mayor 4,3 cm de diámetro mayor), y en 13 (37,1%) pacientes se objetivó un HCC muticéntrico ( $\geq 4$  nódulos) tras el estudio anatomopatológico. No ha sido posible caracterizar el número medio de lesiones en estos casos, puesto que en muchos de los informes de anatomía patológica no se especificó este dato.

Tabla 7: Características anatomopatológicas de los HCC asociados a VHC respecto a los criterios de Milan

CRITERIOS DE MILAN (estudio pretrasplante) (n=67*)	HCC dentro de criterios de Milan (estudio histológico) (n=39, 58,2%)	HCC fuera de los criterios de Milan (estudio histológico) (n=28, 41,8%)
Nódulo único <5 cm (n=32)	29 (90,6%) <sup>1</sup>	3 (9,4%) <sup>1</sup>
2-3 nódulos < 3cm (n=35)	10 (28,6%) <sup>2</sup>	25 (71,4%) <sup>1</sup>
		Por tamaño: 12 (34,3%) <sup>2</sup>
		Por multicentricidad: 13 (37,1%) <sup>2</sup>

\*Datos no disponibles en 3 pacientes (necrosis del tumor por tratamiento previo).

<sup>1</sup>Se muestra el porcentaje de los tumores que cumplen o no los criterios de Milan del total de pacientes con nódulo único. <sup>2</sup> Se muestra el porcentaje de los tumores que cumplen o no los criterios de Milan del total de pacientes con 2-3 nódulos.

Los pacientes trasplantados con 2 o 3 nódulos de HCC excedieron con mayor frecuencia los criterios de Milán que los pacientes con nódulo único [71,4% vs 9,4%; OR= 24,2; IC 95% 6-97,7; p<0,001].

Respecto a la invasión vascular, ésta se demostró en el análisis histológico en 7 (11,1%) de los 63 pacientes en los que hubo datos suficientes para realizar este análisis, estando sólo dos de ellos dentro de los criterios de Milan; 2 casos los excedían por tamaño y otros 3 por multicentricidad.

### 3.2.2 Pacientes con HCC asociado a cirrosis alcohólica (n=21)

Todos los pacientes trasplantados por HCC sobre cirrosis alcohólica a partir de 1997 (n=18) cumplían los criterios de Milán en el estudio pretrasplante. Los 3 trasplantes por HCC asociado a cirrosis enólica realizados previamente no se consideraron para este análisis.

Sin embargo, 8 pacientes (44,4%) excedieron los criterios de Milán al realizar el estudio anatomopatológico del explante (tabla 8).

En uno (14,3%) de los 7 pacientes con nódulo tumoral único, éste medía más de 5 cm en el estudio de la pieza de hepatectomía (8,8 cm de diámetro mayor). Once pacientes presentaron dos o tres nódulos; en tres de ellos (27,3%) se excedieron los criterios de Milán por presentar alguno de los nódulos un tamaño mayor de 3 cm (media 4,8 cm). En el estudio anatomopatológico, se confirmó la presencia de un HCC multicéntrico (más de 3 nódulos) en 4 (36,4%) pacientes. En uno de los casos se observaron metástasis peritoneales durante la cirugía del trasplante, confirmándose el diagnóstico tras el estudio histológico de las muestras enviadas en la propia cirugía.

Del mismo modo que en los HCC asociados a VHC, los pacientes con HCC asociado a cirrosis alcohólica trasplantados con 2 o 3 nódulos de HCC excedieron con mayor frecuencia los criterios de Milán que los pacientes con nódulo único, aunque la asociación sólo alcanzó una tendencia estadística [63,6% vs 14,3%; OR=10,5; IC95% 0,9-121,4; p=0,06].

**Tabla 8:** Características anatomopatológicas de los HCC asociados a cirrosis alcohólica respecto a los criterios de Milan

CRITERIOS DE MILAN (estudio pretrasplante) (n=18)	HCC dentro de criterios de Milan (estudio histológico) (n=10, 55,6%)	HCC fuera de los criterios de Milan (estudio histológico) (n=8, 44,4%)
Nódulo único <5 cm (n=7)	6 (85,7%) <sup>1</sup>	1 (14,3%) <sup>1</sup>
2-3 nódulos <3cm (n=11)	4 (36,4%) <sup>2</sup>	7 (63,6%) <sup>2</sup>
		Por tamaño: 3 (27,3%) <sup>2</sup>
		Por multicentricidad: 4* (36,4%) <sup>2</sup>

\*Uno de ellos presentó metástasis peritoneales <sup>1</sup>Se muestra el porcentaje de los tumores que cumplen o no los criterios de Milan del total de pacientes con nódulo único. <sup>2</sup>Se muestra el porcentaje de los tumores que cumplen o no los criterios de Milan del total de pacientes con 2-3 nódulos.



En 3 (17,6%) de los 17 pacientes válidos para el estudio de la invasión vascular, se demostró ésta en el explante, siendo extensa en un paciente, con extensión portal macroscópica. Ninguno de ellos cumplía los criterios de Milan; dos los excedían por multicentricidad (siendo uno de ellos el caso que presentó metástasis peritoneales), y el otro los excedía por tamaño.

### 3.2.3 Estudio comparativo del HCC en función de la etiología

Se procedió al análisis comparativo de ambas poblaciones. No se observaron diferencias en la concordancia histológica con los criterios de Milan, ni en la frecuencia de invasión vascular en el explante (tabla 9, figura 7), aunque la tasa de invasión vascular fue mayor en los pacientes con HCC asociado a cirrosis enólica.

Tabla 9: Estudio comparativo de las características del HCC en función de la etiología de la cirrosis

	HCC- VHC (n=67)	HCC- alcohol (n=18)	P <sup>1</sup>
<b>HCC fuera de los criterios de Milán</b>	28 (41,8%)	8 (44,4%)	1
<ul style="list-style-type: none"> <li>nódulo único por tamaño &gt;5cm</li> <li>2-3 nódulos por tamaño &gt;3cm</li> <li>2-3 nódulos por multicentricidad (4 o más nódulos)</li> </ul>	3 (9,4%) 12 (34,3%) 13 (37,1%)	1 (14,3%) 3 (27,3%) 4 (36,4%)	0,56 1 1
<b>Invasión vascular</b>	7/63 (11,1%)	3/17 (17,6%)	0,43

1 Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado con el test exacto de Fisher de dos colas. Se muestra el número absoluto y el porcentaje del total de los tumores en función del motivo por el que exceden Milan.

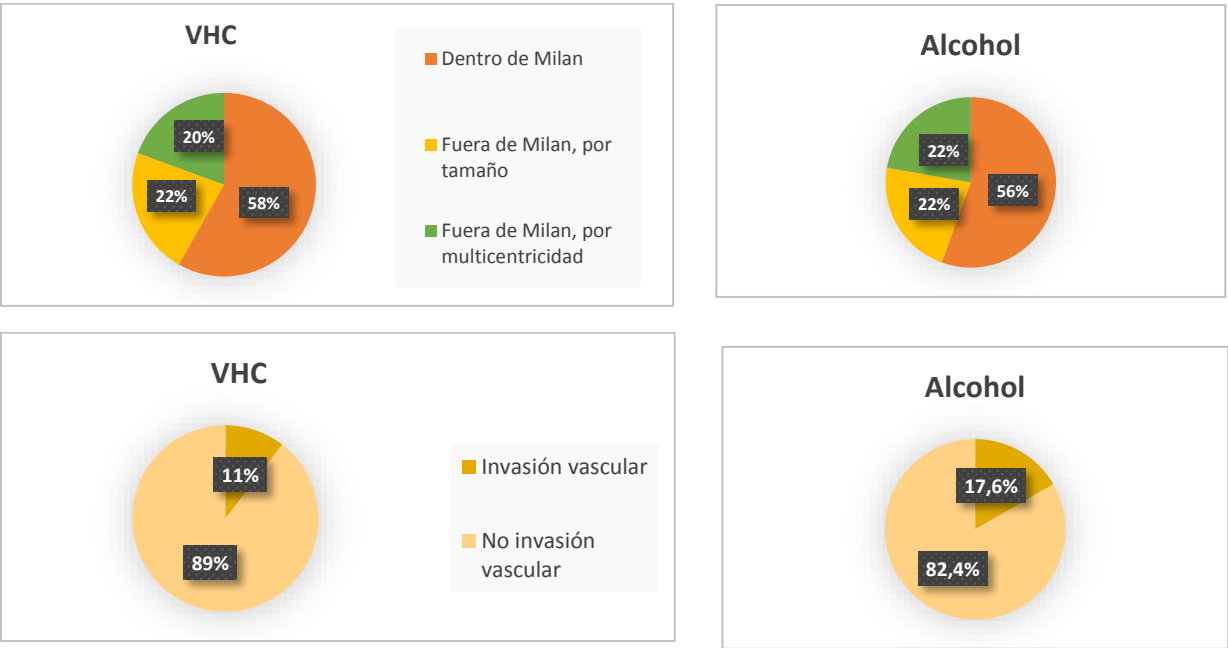


Figura 7: Adecuación a los criterios de Milan (arriba) y la presencia de invasión vascular en el explante (abajo), en función de la etiología de la cirrosis.

## 4. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE HEPATOCARCINOMA

Para analizar las variables demográficas y clínicas asociadas con el desarrollo de HCC, se estudiaron las diferencias entre los pacientes cirróticos en los que se demostró un HCC en el explante, y los pacientes que presentaron cirrosis hepática sin HCC. Este análisis se realizó en las dos cohortes de pacientes incluidas en el estudio.

### 4.1 Enfermedad relacionada con VHC

Los pacientes con HCC asociado a VHC tenían mayor edad al trasplante que los pacientes sin HCC ( $p=0,007$ ), y eran con más frecuencia varones, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ( $p=0,06$ ). Los pacientes cuya indicación de trasplante hepático era HCC presentaron menor puntuación en la escala de Child-Pugh ( $p<0,001$ ). Sólo dos pacientes con cirrosis VHC sin HCC recibieron un trasplante hepático en estadio A de Child. Al revisar la historia clínica, en ambos pacientes se sospechaba un HCC en base a dos pruebas de imagen compatibles, y esa fue la indicación del trasplante, aunque posteriormente no se confirmó en el explante.

Para el resto de las variables, los pacientes infectados por VHC con y sin HCC fueron similares (tabla 10), y tampoco hubo diferencias entre los pacientes con infección por genotipo 1 del VHC respecto a infección por genotipos no 1.

**Tabla 10:** Estudio comparativo de las características demográficas y clínicas de los pacientes con cirrosis VHC según la existencia de HCC.

	Cirrosis VHC (n=202)		p
	Con HCC n=79	Sin HCC n=123	
Edad, años [X±DE]	56,4 ± 7.9	53,5 ± 9,1	<b>0,007<sup>1</sup></b>
Sexo masculino [n (%)]	62 (78,5%)	80 (65%)	<b>0,06<sup>2</sup></b>
Genotipo VHC*			
Genotipo 1	65 (87,8%)	90 (89,1%)	0,89 <sup>2</sup>
Genotipo no-1	9 (12,2%)	11 (10,9%)	
Diabetes mellitus [n (%)]	16 (20.3%)	24 (19,5%)	0,98 <sup>2</sup>
Child-Turcotte-Pugh** [X±DE]	7,7 ± 1,8	9,2 ± 1.6	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
Estadio Child- Turcotte- Pugh **[n (%)]			
A	19 (28,4%)	2 (1,7%)	<b>&lt;0,001<sup>3</sup></b>
B	39 (58,2%)	66 (57,4%)	
C	9 (13,4%)	47 (40,9%)	

\*dato disponible en 74 pacientes con HCC asociado a VHC y en 101 pacientes sin HCC.

\*\* dato disponible en 67 pacientes con HCC asociado a VHC y en 115 pacientes sin HCC.

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1), de Chi cuadrado con la corrección de Yates (2), o de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (3) .

Se realizó el mismo estudio comparativo incluyendo sólo a los pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC, con resultados similares (tabla 11). Se mantuvieron las diferencias en las características demográficas (edad y sexo) y en la puntuación en la escala de Child-Pugh entre los pacientes con y sin HCC.

**Tabla 11:** Estudio comparativo de las características demográficas y clínicas de los pacientes con cirrosis VHC genotipo 1 según la existencia de HCC.

	VHC genotipo 1 (n=155)		p
	Con HCC (n=65)	Sin HCC (n=90)	
Edad, años [X±DE]	57,3±8	54,3±9	<b>0,03<sup>1</sup></b>
Sexo masculino [n (%)]	52 (80%)	58 (64,4%)	<b>0,05<sup>2</sup></b>
Diabetes mellitus [n (%)]	12 (18,4%)	17 (18,8%)	0,92 <sup>2</sup>
Child-Turcotte-Pugh [X±DE]	7,7±1,9	9,1±1,6	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
Estadío Child- Turcotte- Pugh* [n (%)]			
A	17 (29,3%)	1 (1,2%)	<b>&lt;0,001<sup>3</sup></b>
B	33 (56,9%)	55 (64%)	
C	8 (13,8%)	30 (34,9%)	

\*Dato disponible en 58 pacientes con HCC y 86 pacientes sin HCC

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1), de Chi cuadrado con la corrección de Yates (2), o de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (3) .

## 4.2 Cirrosis alcohólica

Se analizó la asociación de las variables demográficas y clínicas con el desarrollo de HCC, comparando estos datos entre los pacientes con HCC (n=21, 19,3%), y los pacientes con cirrosis alcohólica sin HCC (n=88, 80,7%), tabla 12.

**Tabla 12:** Estudio comparativo de las características demográficas y clínicas de los pacientes con cirrosis alcohólica según la existencia de HCC.

	Cirrosis alcohólica (n=109)		p
	Con HCC (n=21)	Sin HCC (n=88)	
Edad, años [X±DE]	55,6 ± 7,8	50,6 ± 9,3	<b>0,03<sup>1</sup></b>
Sexo masculino [n (%)]	21 (100%)	80 (90,9%)	0,35 <sup>2</sup>
Diabetes mellitus [n (%)]	4 (19%)	13 (14,8%)	0,74 <sup>2</sup>
Child-Turcotte-Pugh** [X±DE]	7,2 ± 2	9,4± 1,5	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>
Estadío Child- Turcotte- Pugh * [n (%)]			
A	7 (53,8%)	1 (1,8%)	<b>&lt;0,001<sup>3</sup></b>
B	4 (30,8%)	26 (47,3%)	
C	2 (15,4%)	28 (50,9%)	

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1), de Chi cuadrado con el test exacto de Fisher (2), o de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (3).

Todos los pacientes con HCC en el explante fueron varones, y presentaron mayor edad que los pacientes trasplantados por cirrosis sin HCC ( $p=0,03$ ). Los pacientes con cirrosis alcohólica con HCC presentaban menor puntuación en la escala de Child-Pugh, estando el 53,8% en estadio A. Por el contrario, sólo uno de los pacientes sin HCC en el explante (1,8%) se encontraba en estadio A de Child; en este caso, pese a que no fue confirmado, las pruebas de imagen hacían sospechar nódulo de HCC y la indicación del trasplante se realizó en base a dicha sospecha.

## 5. POLIMORFISMOS DE *IL28B* Y DE *TLRs*

Se analizaron los polimorfismos de *IL28B* y *TLRs* en todos los pacientes. En el caso de *TLR7* y *TLR8*, localizados en el cromosoma X, se realizó un análisis por separado de los polimorfismos genéticos en varones y mujeres. Al realizar el estudio del polimorfismo Arg753Gln de *TLR2*, sólo 3 pacientes (0,96%) eran portadores del alelo variante, por lo que este polimorfismo no ha sido incluido en los estudios comparativos entre los diferentes grupos de pacientes. Se comprobó que todos los polimorfismos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) (tabla 13).

### 5.1 Estudio comparativo de la distribución genotípica de los polimorfismos de *IL28B* y de *TLRs* entre los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica

La distribución genotípica de los polimorfismos analizados se resume en la tabla 13.

**Tabla 13:** Distribución genotípica de los SNP en los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica.

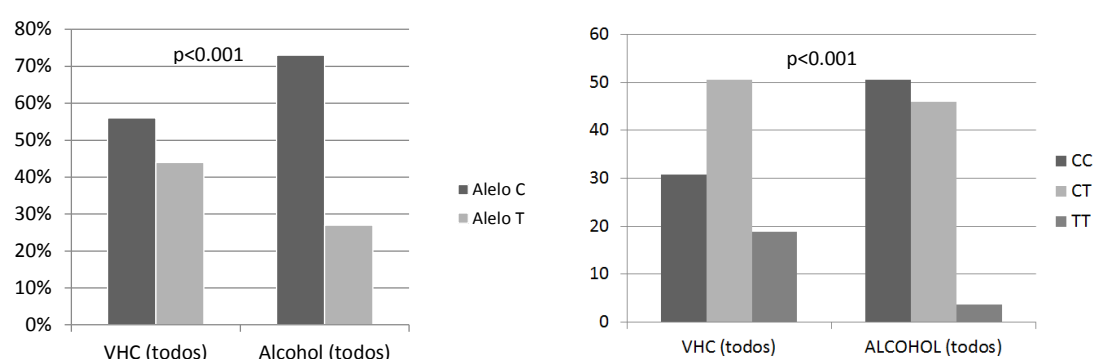
Gen	Polimorfismo	Genotipo	Cirrosis VHC (n= 202)	Cirrosis alcohólica (n= 109)	P <sup>1</sup>	HW (VHC)	HW (alcohólica)
<b><i>IL28B</i></b>	rs12979860 C/T	CC	62 (30,7%)	55 (50,5%)	<0,001 <sup>1</sup>	0,73	0,07
		CT	102 (50,5%)	50 (45,9%)			
		TT	38 (18,8%)	4 (3,7%)			
<b><i>TLR3</i></b>	Leu412Phe	CC	86 (42,6%)	45 (41,3%)	1 <sup>1</sup>	0,62	0,98
		CT	94 (46,5%)	50 (45,9%)			
		TT	22 (10,9%)	14 (12,8%)			
<b><i>TLR4</i></b>	Asp299Gly	AA	181 (89,6%)	98 (89,6%)	0,93 <sup>2</sup>	0,43	0,58
		AG	21(10,4%)	11 (10,1%)			
<b><i>TLR7</i></b>	Glu11Leu (mujeres) n= 60 (VHC), n=8 (alcohol)	AA	41 (68,3%)	5 (62,5%)	0,59 <sup>1</sup>	0,4	0,51
		AT	16 (26,7%)	3 (37,5%)			
		TT	3 (5%)	0			
	Glu11Leu (varones) n= 142 (VHC), n=101 (alcohol)	A	121 (85,2%)	73 (72,3%)	0,021 <sup>2</sup>	-	-
		T	21 (14,8%)	28 (27,7%)			
<b><i>TLR8</i></b>	Met1Val (mujeres) n= 60 (VHC), n=8 (alcohol)	AA	28 (46,7%)	3 (37,5%)	0,56 <sup>1</sup>	0,19	0,2
		AG	29 (48,3%)	5 (62,5%)			
		GG	3 (5%)	0			
	Met1Val (varones) n= 142 (VHC), n=101 (alcohol)	A	101 (71,6%)	71 (70,3%)	0,93 <sup>2</sup>	-	-
		G	40 (28,4%)	30 (29,7%)			
<b><i>TLR9</i></b>	-1237T>C	CC	5 (2,5%)	3 (2,8%)	0,73 <sup>1</sup>	0,18	0,53
		CT	39 (19,3%)	25 (22,9%)			
		TT	158 (78,2%)	81 (74,3%)			
	-1486T>C	CC	35 (17,3%)	21 (19,3%)	0,34 <sup>1</sup>	0,39	0,69
		CT	91 (45%)	56 (51,4%)			
		TT	76 (37,6%)	32 (29,4%)			

HW: equilibrio de Hardy-Weinberg.

\*Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (1), o de Chi cuadrado con la corrección de Yates para tablas de contingencia 2x2 (2).

### 5.1.1 Polimorfismo rs12979860 C/T de *IL28B*

La distribución genotípica del polimorfismo rs12979860 C/T de la *IL28B* entre los pacientes con cirrosis por VHC y los pacientes con cirrosis alcohólica fue distinta ( $p<0,001$ ), como se ilustra en la figura 8. El alelo variante T fue más frecuente en los pacientes con cirrosis VHC que en los pacientes con cirrosis alcohólica (OR=2,17, IC 95% 1,52-3,11;  $p<0,001$ ). El genotipo TT fue más frecuente en los pacientes con enfermedad relacionada con cirrosis VHC que en los pacientes con cirrosis alcohólica [TT vs CT + CC: OR= 7,32; IC 95% 2,15 -24,92;  $p<0,001$ ], independientemente del genotipo viral ( $p=1$ ).



**Figura 8:** Distribución alélica (izquierda) y genotípica (derecha) del polimorfismo de la *IL28B* según la etiología de la cirrosis.

El genotipo CC se encontró con menos frecuencia en los pacientes con VHC que en los pacientes con cirrosis alcohólica [CC vs CT+TT: OR=0,43; IC 95% 0,26-0,7;  $p=0,001$ ]. En este caso, sí se observaron diferencias respecto al genotipo del VHC: el genotipo CC fue menos frecuente en los pacientes con infección por el genotipo 1 del VHC que en los pacientes infectados por genotipos no-1 del VHC [CC vs CT+TT: OR=0,26; IC 95% 0,1–0,69;  $p=0,009$ ] y que en los pacientes con cirrosis alcohólica [CC vs CT+TT: OR=0,56; IC 95% 0,41 – 0,77;  $p<0,001$ ] (tabla 14).

**Tabla 14:** Estudio comparativo de la distribución genotípica del polimorfismo de *IL28B* en los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica.

<i>IL28B</i>	Cirrosis VHC			Cirrosis alcohólica (n=109)	p (Gt1 vs alcohol)	p (Gt no-1 vs alcohol)
	Genotipo 1 (n=155)	Genotipo no-1 (n=20)	p			
CC	44 (28,4%)	12 (60%)	<b>0,01<sup>1</sup></b>	55 (50,5%)	<b>&lt;0,001<sup>1</sup></b>	<b>0,07<sup>1</sup></b>
CT	84 (54,2%)	5 (25%)		50 (45,9%)		
TT	27 (17,4%)	3 (15%)		4 (3,7%)		

Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (1).

### 5.1.2 Polimorfismos de *TLRs*

Respecto a los polimorfismos estudiados en los *TLRs*, no se encontraron diferencias entre los pacientes con enfermedad hepática por VHC y por alcohol, salvo en el polimorfismo Glu11Leu de *TLR7* en varones (tabla 13). El alelo A fue más frecuente en los varones con cirrosis VHC que en los varones con cirrosis alcohólica (OR=2,21; IC 95% 1,17 – 4,17; p=0,02), mientras que en las mujeres no se observaron diferencias, aunque debido al escaso número de mujeres en la cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica los resultados no son valorables.

La distribución del polimorfismo Glu11Leu de *TLR7* fue similar entre los varones infectados por genotipos 1 y no-1 del VHC (p=0,46), siendo el alelo A más frecuente tanto en los varones infectados por el genotipo 1 del VHC (OR=2,52; IC 95% 1,24 – 5,13; p=0,01), como en los varones infectados por genotipos no-1 del VHC (OR=6,9; IC 95% 0,88 – 54,18; p= 0,04), que en los varones con cirrosis alcohólica (tabla 15).

**Tabla 15:** Estudio comparativo de la distribución genotípica del polimorfismo de *TLR7* en los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica.

<i>TLR7</i> Glu11Leu (varones)	Cirrosis VHC		p	Cirrosis alcohólica	p (Gt1 vs alcohol)	p (Gt no-1 vs alcohol)
	Genotipo 1 (n=110)	Genotipo no-1 (n=15)		(n=101)		
A	92 (83,64%)	14 (93,3%)	0,46 <sup>1</sup>	73 (72,3%)	<b>0,01<sup>1</sup></b>	<b>0,04<sup>1</sup></b>
T	18 (16,4%)	1 (6,7%)		28 (27,7%)		

Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado con la corrección de Yates para tablas de contingencia 2x2 (1).

### 5.1.3 Estudio combinado de los polimorfismos de *IL28B* y *TLR7*

Se realizó el estudio combinado de los polimorfismos que alcanzaron la significación estadística para analizar la relación entre ambos. El estudio se realizó sólo en varones (tabla 16).

**Tabla 16:** Estudio comparativo de los polimorfismos de *IL28B* y *TLR7* en los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica.

Polimorfismo	Cirrosis VHC (n= 142)	Cirrosis alcohólica (n= 101)	p <sup>1</sup>
<b><i>IL28B</i> TT y <i>TLR7</i> A (varones)</b>	Si: 24 (16,9%) No: 118 (83,1%)	Si: 2 (2,0%) No: 99 (98,0%)	<b>&lt;0,001</b>
<b><i>IL28B</i> TT o <i>TLR7</i> A (varones)</b>	Si: 123 (86,6%) No: 19 (13,4%)	Si: 74 (73,3%) No: 27 (26,7%)	<b>0,014</b>

<sup>1</sup>Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado con la corrección de Yates para tablas de contingencia 2x2.

La presencia simultánea del genotipo TT en el polimorfismo de *IL28B* y del alelo A en el polimorfismo de *TLR7* fue más frecuente en los varones con cirrosis VHC que en los varones con cirrosis enólica (OR=10,1, IC 95% 2,32-43,66;  $p<0,001$ ). La fuerza de la asociación fue mayor en los pacientes portadores de ambos genotipos que si se presenta en sólo uno de ellos, demostrando el efecto aditivo de los mismos (tabla 17).

**Tabla 17:** Estudio comparativo de los polimorfismos de *IL28B* y *TLR7* en los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica.

Polimorfismo	OR, IC 95%	p <sup>1</sup>
<i>IL28B</i> TT	7,32 (2,15 -24,92)	<0,001
TLR7 A (varones)	2,21 (1,17 – 4,17)	0,02
<i>IL28B</i> TT o <i>TLR7</i> A (varones)	2,36 (1,23 – 4,54)	0,01 <sup>1</sup>
<i>IL28B</i> TT y <i>TLR7</i> A (varones)	10,1 (2,32-43,66)	<0,001



## 5.2 Implicación de los polimorfismos de *IL28B* y de *TLRs* en el desarrollo de hepatocarcinoma

Para analizar la relación de los polimorfismos estudiados con el desarrollo de HCC se comparó la distribución genotípica de los pacientes con y sin HCC en cada una de las dos cohortes del estudio.

La distribución genotípica de los polimorfismos de *IL28B* y *TLRs* fue similar en los pacientes con y sin HCC independientemente de la etiología de la cirrosis, es decir, tanto en la cohorte de pacientes con cirrosis VHC (tabla 18), en el subgrupo de pacientes infectados por el genotipo 1 del VHC (tabla 19) y en los pacientes con cirrosis alcohólica (tabla 20).

**Tabla 18:** Distribución genotípica de los polimorfismos analizados según la presencia o no de HCC en los pacientes con cirrosis VHC.

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Hepatocarcinoma		P
			SI (n=79)	NO (n=123)	
IL28B	rs12979860 C/T	CC	25 (31,6%)	37 (30,1%)	0,84 <sup>1</sup>
		CT	38 (48,1%)	64 (52%)	
		TT	16 (20,3%)	22 (17,9%)	
TLR3	Leu412Phe	CC	33 (41,8%)	53 (43,1%)	0,92 <sup>1</sup>
		CT	38 (48,1%)	56 (45,5%)	
		TT	8 (10,1%)	14 (11,4%)	
TLR4	Asp299Gly	AA	73 (92,4%)	108 (87,8%)	0,42 <sup>2</sup>
		AG*	6 (7,6%)	15 (12,2%)	
TLR7	Glu11Leu (mujeres) (n= 60)	AA	12 (70,6%)	29 (67,4%)	0,26 <sup>1</sup>
		AT	3 (17,6%)	13 (30,2%)	
		TT	2 (11,8%)	1 (2,3%)	
	Glu11Leu (varones) (n=142)	A	52 (83,9%)	69 (86,3%)	0,87 <sup>2</sup>
		T	10 (16,1%)	11 (13,8%)	
	TLR8	Met1Val (mujeres) (n=60)	AA	7 (41,2%)	21 (48,8%)
AG			9 (52,9%)	20 (46,5%)	
GG			1 (5,9%)	2 (4,7%)	
Met1Val (varones) (n=142)		A	45 (72,6%)	56 (70,9%)	0,97 <sup>2</sup>
		G	17 (27,4%)	23 (21,1%)	
TLR9		-1237T>C	CC	1 (1,3%)	4 (3,3%)
	CT		15 (19%)	24 (19,5%)	
	TT		63 (79,7%)	95 (77,2%)	
	-1486T>C	CC	11 (13,9%)	24 (19,5%)	0,59 <sup>1</sup>
		CT	37 (46,8%)	54 (43,9%)	
		TT	31 (39,2%)	45 (36,6%)	

\*ningún paciente presentó el genotipo GG en el polimorfismo Asp299Gly de *TLR4*

Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (1), o de Chi cuadrado con la corrección de Yates para tablas 2x2 (2).

**Tabla 19:** Distribución genotípica de los polimorfismos analizados según la presencia o no de HCC en los pacientes con cirrosis VHC, genotipo 1.

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Hepatocarcinoma		p <sup>1</sup>
			SI (n=65)	NO (n=90)	
<b>IL28B</b>	rs12979860 C/T	CC	18 (27,7%)	26 (28,9%)	0,51 <sup>1</sup>
		CT	33 (50,8%)	51 (56,7%)	
		TT	14 (21,5%)	13 (14,4%)	
<b>TLR3</b>	Leu412Phe	CC	25 (38,5%)	40 (44,4%)	0,75 <sup>1</sup>
		CT	34 (52,3%)	42 (46,7%)	
		TT	6 (9,2%)	8 (8,9%)	
<b>TLR4</b>	Asp299Gly	AA	59 (90,8%)	80 (88,9%)	0,91 <sup>2</sup>
		AG*	6 (9,2%)	10 (11,1%)	
<b>TLR7</b>	Glu11Leu (mujeres) (n= 45)	AA	9 (69,2%)	20 (64,4%)	0,65 <sup>1</sup>
		AT	3 (23,1%)	11 (34,4%)	
		TT	1 (7,7%)	1 (3,1%)	
	Glu11Leu (varones) (n= 110)	A	43 (82,7%)	49 (84,5%)	1 <sup>2</sup>
		T	9 (17,3%)	9 (15,5%)	
	<b>TLR8</b>	Met1Val (mujeres) (n= 45)	AA	6 (46,2%)	16 (50%)
AG			6 (46,2%)	15 (46,9%)	
GG			1 (7,7%)	1 (3,1%)	
Met1Val (varones) (n= 110)		A	38 (73,1%)	39 (68,4%)	0,74 <sup>2</sup>
		G	14 (26,9%)	18 (31,6%)	
<b>TLR9</b>		-1237T>C	CC	1 (1,5%)	4 (4,4%)
	CT		12 (18,5%)	16 (17,8%)	
	TT		52 (80%)	70 (77,8%)	
	-1486T>C	CC	9 (13,8%)	13 (14,4%)	0,94 <sup>1</sup>
		CT	30 (46,2%)	39 (43,3%)	
		TT	26 (40%)	38 (42,2%)	

\*ningún paciente presentó el genotipo GG en el polimorfismo Asp299Gly de *TLR4*

Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (1), o de Chi cuadrado con la corrección de Yates para tablas 2x2 (2).

**Tabla 20:** Distribución genotípica de los polimorfismos analizados según la presencia o no de HCC en los pacientes con cirrosis alcohólica

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Hepatocarcinoma		p <sup>1</sup>
			SI (n=65)	NO (n=90)	
<b>IL28B</b>	rs12979860 C/T	CC	10 (47,6%)	45 (51,1%)	0,91 <sup>1</sup>
		CT	10 (47,6%)	40 (45,5%)	
		TT	1 (4,8%)	3 (3,7%)	
<b>TLR3</b>	Leu412Phe	CC	10 (47,6%)	35 (39,8%)	0,38 <sup>1</sup>
		CT	10 (47,6%)	40 (45,5%)	
		TT	1 (4,8%)	13 (14,8%)	
<b>TLR4</b>	Asp299Gly	AA	19 (90,5%)	79 (89,8%)	1 <sup>2</sup>
		AG*	2 (9,5%)	9 (10,2%)	
<b>TLR7</b>	Glu11Leu (varones**) (n= 101)	A	16 (76,2%)	57 (71,3%)	0,86 <sup>2</sup>
		T	5 (23,8%)	23 (28,8%)	
<b>TLR8</b>	Met1Val (varones**) (n= 101)	A	15 (71,4%)	56 (70%)	1 <sup>2</sup>
		G	6 (28,6%)	24 (30%)	
<b>TLR9</b>	-1237T>C	CC	0	3 (3,4%)	0,52 <sup>1</sup>
		CT	5 (23,8%)	20 (22,7%)	
		TT	16 (76,2%)	65 (73,9%)	
	-1486T>C	CC	4 (19%)	17 (19,3%)	0,17 <sup>1</sup>
		CT	14 (66,7%)	42 (47,7%)	
		TT	3 (14,3%)	29 (33%)	

\*ningún paciente presentó el genotipo GG en el polimorfismo Asp299Gly de *TLR4*

\*\*no se realizó el análisis en mujeres por número de casos insuficiente

Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado para tablas de contingencia 2x3 (1), o de Chi cuadrado con la corrección de Yates para tablas 2x2 (2).

## 6. RECIDIVA DE HCC POSTRASPLANTE

Se registraron los casos de recidiva de HCC durante el seguimiento postrasplante. Para el estudio, se excluyeron los pacientes con un seguimiento postrasplante menor de 6 meses, así como un paciente con HCC asociado a cirrosis alcohólica que presentó metástasis peritoneales diagnosticadas durante la cirugía del trasplante, por estar la recidiva en este enfermo directamente en relación con la persistencia de la enfermedad y no ser válido para el estudio de otros factores. Se incluyeron, finalmente, 64 pacientes con HCC asociado a VHC y 17 pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica (n=81). El tiempo medio de seguimiento fue de 64 meses.

El proceso de selección de los pacientes se muestra en la figura 9.

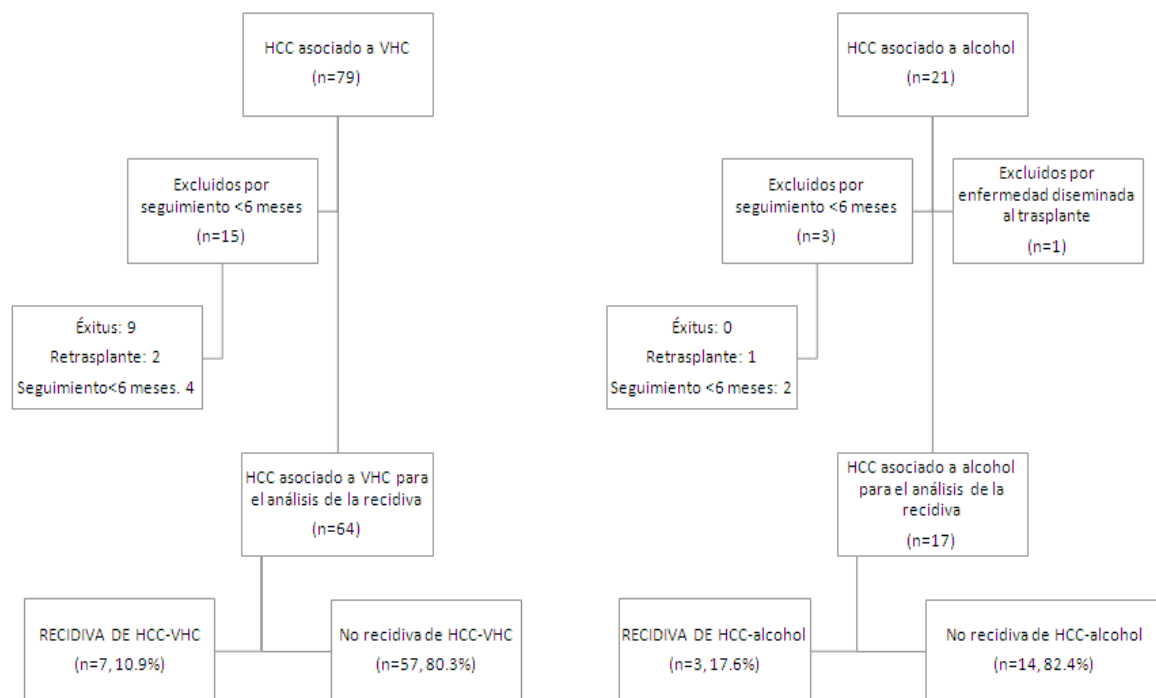


Figura 9: Proceso de selección de los casos de HCC para el estudio de la recidiva postrasplante.

Hubo un total de 10 casos de recidiva (12,3%), 7 (10,9%) en la cohorte de pacientes con HCC asociado a la cirrosis por VHC y 3 (17,6%) en la cohorte de pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica, sin observar diferencias en la tasa de recidiva de HCC en función de la etiología de la cirrosis ( $p=0,43$ ).

El tiempo medio desde el trasplante hepático hasta la recidiva fue de  $58 \pm 38,3$  meses (mediana de 45 meses, rango 10-109 meses), siendo similar en ambas etiologías ( $p=0,46$ ), como se muestra en la figura 10. Es importante destacar que dos pacientes

presentaron recidiva del HCC tras más de 100 meses de seguimiento, uno con cirrosis alcohólica y recidiva del HCC sobre injerto hepático no cirrótico, y el otro paciente trasplantado por HCC asociado a VHC, con recidiva tardía del HCC, aunque en este caso, el paciente presentaba recidiva grave de la infección por VHC con cirrosis del injerto, por lo que no podría descartarse que se tratara de un HCC de novo. Si no se tienen en cuenta estos dos casos de recidiva tardía, el tiempo medio hasta la recidiva fue de  $37.8 \pm 20.3$  meses (mediana de 34 meses, rango 10-66 meses).

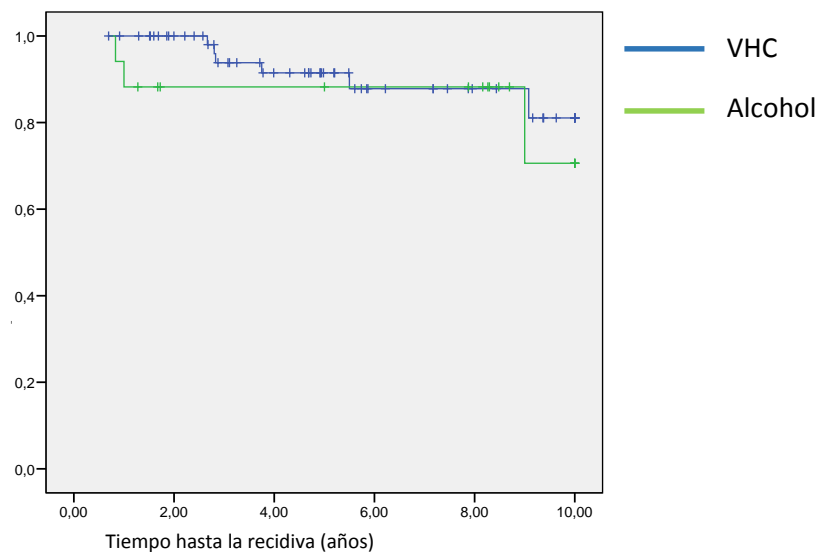


Figura 10: Curva del tiempo hasta la recidiva en función de la etiología

En el grupo de pacientes que recibieron trasplante hepático por cirrosis, bien asociada a infección por VHC, bien alcohólica, no se observaron casos de HCC de novo.

## 6.1 Factores relacionados con la recidiva del HCC

Para analizar la implicación de los polimorfismos analizados en este trabajo en el riesgo de recidiva de HCC en el injerto, se estudió la relación entre ellos y el desarrollo de recidiva en nuestra población, así como su asociación con otros factores clásicamente relacionados con la recidiva de HCC (tumores fuera de los criterios de Milan en el estudio anatomopatológico del explante y demostración histológica de invasión vascular).

### 6.1.1 Características demográficas y clínicas.

En primer lugar, se realizó un análisis para explorar la influencia de distintas variables demográficas y clínicas en el riesgo de recidiva postrasplante del HCC. Para ello, se comparó la edad al trasplante, el sexo del paciente y la presencia de DM pretrasplante en los pacientes que reciben trasplante hepático por HCC, en función de si se observó o no recidiva de la enfermedad durante el seguimiento. En los pacientes con HCC asociado a VHC se analizó además el genotipo viral. No se observaron diferencias entre los pacientes con recidiva de HCC y los pacientes que no la presentaron en ninguna de las variables estudiadas (tabla 21).

Tabla 21: Análisis de la recidiva del HCC respecto a las características demográficas y clínicas

	Recidiva HCC (n=10, 12,3%)	No recidiva HCC (n=71, 87,6%)	p
Edad, años [X±DE]	53,56 ± 11,4	55,97 ± 8,1	0,4 <sup>1</sup>
Sexo masculino [n (%)]	9 (90%)	60 (84,5%)	1 <sup>2</sup>
Genotipo VHC*			
Genotipo 1 (n=53)	5 (83,3%)	48 (87,3%)	1 <sup>2</sup>
Genotipo no-1 (n=8)	1 (16,7%)	7 (12,7%)	
Diabetes mellitus [n (%)]	2 (20%)	12 (17,4%)	1 <sup>2</sup>

\* Estudio realizado en los pacientes con HCC-VHC válidos para el análisis de la recidiva (n=61).

Valor de p calculado mediante el test de T de student (1), o de Chi cuadrado con el test exacto de Fisher (2).

### 6.1.2 Concordancia de los criterios de Milan

Se analizó la relación entre la recidiva de HCC y la concordancia con los criterios de Milan en el análisis histológico del explante. Puesto que se trata de un dato procedente de la revisión del explante, se analizaron los datos de todos los pacientes, incluidos los trasplantados antes de la generalización del uso de los criterios de Milan en la práctica clínica de rutina. Con la intención de estudiar la influencia del tamaño y el número de nódulos en el riesgo de recidiva, se han recogido los datos anatomopatológicos de todos los explantes y se han clasificado *a posteriori*, de forma académica, en base a los criterios actuales como dentro o fuera de Milan. En la tabla 22 se muestra la concordancia de los criterios de Milan aplicados en el explante incluyendo a los pacientes trasplantados antes de 1997.

**Tabla 22:** Características anatomopatológicas de los HCC respecto a los criterios de Milan, incluyendo a todos los pacientes

	Criterios de Milan (estudio pretrasplante)	HCC dentro de criterios de Milan (estudio histológico)	HCC fuera de los criterios de Milan (estudio histológico)
	(n=74 <sup>1</sup> )	(n=43)	(n=31)
HCC-VHC	Nódulo único <5 cm (n=36)	33 (91,7%)	3 (8,3%)
	2-3 nódulos < 3cm (n=38)	10 (26,3%)	28 (73,7%)
			Por tamaño: 12 (31,6%)
			Por multicentricidad: 16 (42,1%)
	(n=21)	(n=12)	(n=9)
HCC-alcohol	Nódulo único <5 cm (n=10)	8 (80%)	2 (20%)
	2-3 nódulos <3cm (n=11)	4 (36,4%)	7 (63,6%)
			Por tamaño (>3 cm): 3 (27,3%)
			Por multicentricidad: 4 <sup>2</sup> (36,4%) (4 o más nódulos)

<sup>1</sup>Datos no disponibles en 5 pacientes, por necrosis del tumor tras tratamiento en lista de espera. <sup>2</sup>Uno de ellos presentó metástasis peritoneales

Se analizó la influencia de sobrepasar los criterios de Milan estudiando todos los casos de HCC en su conjunto, independientemente de la etiología, puesto que no hubo diferencias en la tasa de recidiva de HCC asociado a infección por VHC y a cirrosis alcohólica, ni en la concordancia con los criterios de Milan (tabla 23).

**Tabla 23:** Estudio comparativo de la concordancia con los criterios de Milan en función de la etiología de la cirrosis, incluyendo a todos los pacientes

	HCC- VHC	HCC- alcohol	P <sup>1</sup>
<b>HCC fuera de los criterios de Milán</b>	31 (39,2%)	9 (42,9%)	1
• nódulo único por tamaño >5cm	3 (8,3%)	2 (20%)	0,31
• 2-3 nódulos por tamaño >3cm	12 (31,6%)	3 (27,3%)	1
• 2-3 nódulos por multicentricidad	16 (42,1%)	4 (36,4%)	1

(4 o más nódulos)

Del total de pacientes con HCC válidos para el estudio de la recidiva (n=81), en 77 hubo datos en el explante que permitieron evaluar la concordancia con los criterios de Milan.

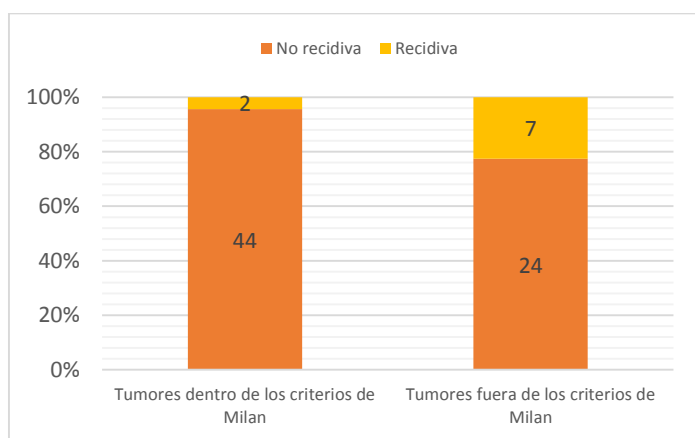
Se observaron 10 recidivas de HCC en el seguimiento postrasplante; en uno de los casos el estadio de Milan en el análisis del explante no fue valorable por haber recibido tratamiento durante su estancia en lista de espera; de los restantes 9 pacientes, todos menos 2 (77,8%) excedían los criterios de Milán, y en dos de ellos se demostró, además de multicentricidad, invasión vascular en el explante. Mientras, de los pacientes que no presentaron recidiva del HCC en el seguimiento (n=68), sólo 24 (35,5%) excedían los criterios de Milan.

Los pacientes que superaron los criterios de Milan en el análisis histológico del explante, presentaron un mayor riesgo de recidiva del tumor durante el seguimiento (OR=6,41; IC 95% 1,23 – 33,3; p=0,026), sin diferencias en función del motivo por el que los exceden (tabla 24, figura 11).

**Tabla 24:** Análisis de la recidiva postrasplante del HCC respecto a la adecuación a los criterios de Milan en el explante

Análisis histológico n=77 (77%)	Recidiva HCC (n=9*, 11,7%)	No recidiva HCC (n=68, 88,3%)	p
<b>Tumores dentro de los criterios de Milan (n=46, 59,7%)</b>	2 (4,3%)	44 (95,7%)	<b>0,026<sup>1</sup></b>
<b>Tumores fuera de los criterios de Milan (n=31, 40,3%)</b>	7 (22,6%)	24 (77,4%)	
Fuera de Milan por tamaño (n=15)	3 (20%)	12 (80%)	0,36
Fuera de Milan por multicentricidad (n=16)	4 (25%)	12 (75%)	0,08

\* En un paciente con recidiva de HCC no fue valorable el análisis histológico.<sup>1</sup>Valor de p calculado mediante el test exacto de Fisher

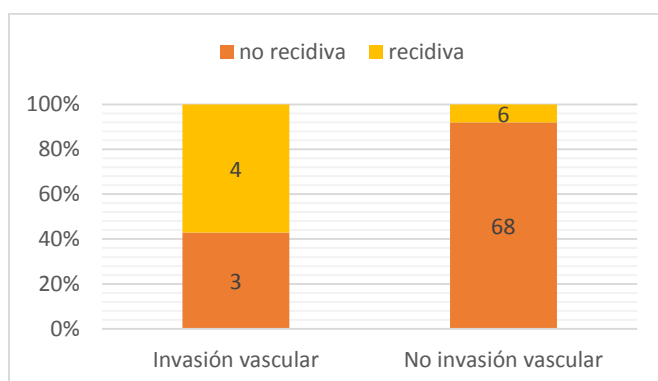


**Figura 11:** Tasa de recidiva postrasplante del HCC respecto a los criterios de Milan



### 6.1.3 Presencia de invasión vascular en el explante

Se detectó la presencia de invasión vascular en el análisis histológico de 7 (8,6%) de los 81 pacientes válidos para el estudio de la recidiva. El 57,4% de los casos con invasión vascular presentaron recidiva de HCC durante el seguimiento, mientras que la tasa de recidiva fue del 9,6% entre los pacientes sin invasión vascular (OR=10,15; IC 95% 1,6 – 61,9; p=0,02) (figura 12).



**Figura 12:** Tasa de recidiva de HCC en función de la invasión vascular

La presencia de invasión vascular fue más frecuente en los pacientes trasplantados por HCC asociado a alcohol (n=4, 23,5%) que en los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC asociado a VHC (n=3, 4,7%), aunque no se alcanzó la significación estadística (tabla 25). Si se analizan los pacientes por etiología, la invasión vascular sólo fue un predictor de recidiva en los pacientes con HCC sobre cirrosis enólica (HCC-alcohol; invasión vascular si vs no: OR=26; IC 95% 1,1 – 604,5; p= 0,06. HCC-VHC: p = 0,29)

**Tabla 25:** Estudio comparativo de la invasión vascular en función de la etiología de la cirrosis

	Invasión vascular	No invasión vascular
<b>Casos de HCC válidos para recidiva (n=81)</b>	7 (8,6%)	74 (91,4%)
HCC-VHC (n=64)	3 (4,7%)	61 (95,3%)
HCC-Acohol (n=17)	4 (23,5%)	13 (76,4%)

### 6.1.4 Polimorfismos de *IL28B* y de *TLRs*

Se analizó la asociación entre los polimorfismos de *IL28B* y *TLRs* con la recidiva del HCC (tabla 26).

Tabla 26: distribución genotípica de los polimorfismos analizados según la recidiva de HCC

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Recidiva de hepatocarcinoma		P <sup>1</sup>
			SI (n=10)	NO (n=71)	
<b><i>IL28B</i></b>	rs12979860 C/T	CC	3 (30%)	26 (36,6%)	0,91 <sup>1</sup>
		CT	5 (50%)	32 (45,1%)	
		TT	2 (20%)	13 (18,3%)	
<b><i>TLR3</i></b>	Leu412Phe	CC	5 (50%)	27 (38%)	0,77 <sup>1</sup>
		CT	4 (40%)	35 (49,3%)	
		TT	1 (10%)	9 (12,7%)	
<b><i>TLR4</i></b>	Asp299Gly	AA	8 (80%)	65 (91,5%)	0.26 <sup>2</sup>
		AG	2 (20%)	6 (8,5%)	
<b><i>TLR7</i></b>	Glu11Leu (varones*) (n=69)	A	7 (77,8%)	52 (86,7%)	0,61 <sup>2</sup>
		T	2 (22,2%)	8 (13,3%)	
<b><i>TLR8</i></b>	Met1Val (varones*) (n=69)	A	5 (55,6%)	46 (76,7%)	0,23 <sup>2</sup>
		G	4 (44,4%)	14 (23,3%)	
<b><i>TLR9</i></b>	-1237T>C	CC	0	1 (1,4%)	0,88 <sup>1</sup>
		CT	2 (20%)	11 (15,5%)	
		TT	8 (80%)	59 (83,1%)	
	-1486T>C	CC	0	11 (15,5%)	<b>0,034<sup>1</sup></b>
		CT	9 (90%)	33 (46,5%)	
		TT	1 (10%)	27 (38%)	

\*No se realizó el análisis en mujeres por número de casos insuficiente (n=1). Valor de p calculado mediante el test de Chi cuadrado de Pearson para tablas 3x2 (1), o con el test de Fisher con dos colas para tablas de contingencia 2x2 (2).

La distribución genotípica del polimorfismo -1486C/T de *TLR9* fue diferente en los pacientes que presentan recidiva del HCC tras el trasplante y los que no muestran recidiva (p=0,034). En concreto, la frecuencia del genotipo CT en dicho polimorfismo fue mayor entre los pacientes con recidiva, comportándose como un factor de riesgo de recidiva del HCC postrasplante (OR=10.36 IC 95% 1,25-86,17; p=0,015).

### 6.1.5 Análisis multivariante de los factores de riesgo de recidiva del HCC postrasplante

Se realizó un análisis multivariante incluyendo todas las variables con una  $p < 0,1$  en el análisis univariante con respecto a la recidiva postrasplante de HCC, esto es: tumores que exceden los criterios de Milan, invasión vascular y el genotipo CT en el polimorfismo -1486C>T en el gen de *TLR9*. Las tres variables fueron factores de riesgo independientes de recidiva del HCC (tabla 27).

Tabla 27: análisis multivariante de los factores independientemente asociados a la recidiva de HCC postrasplante.

Variable	OR (IC 95%)	p <sup>1</sup>
Genotipo CT -1486C>T <i>TLR9</i>	18,2 (1,21-250)	<b>0,036</b>
Invasión vascular	17,5 (1,37-250)	<b>0,027</b>
Excede Milan	6,5 (1,02-41,9)	<b>0,048</b>

A continuación se realizó un análisis multivariante incluyendo la causa por la que se excedían los criterios de Milán. En este modelo, ni exceder los criterios de Milan por tamaño ( $p=0,12$ ) ni por multicentricidad ( $p=0,13$ ) se relacionaban independientemente con la recidiva del HCC. La invasión vascular ( $p=0,03$ ) y el polimorfismo de *TLR9* ( $p=0,02$ ) se mantuvieron como factores de riesgo independientes de recidiva de HCC en el análisis multivariante.

# 7. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA

Para el estudio de la supervivencia actuarial, se registraron los datos de seguimiento de los pacientes del estudio censurando el seguimiento a los 15 años, o antes en caso de fallecimiento. Se excluyeron los casos en los que la información clínica fuera insuficiente (n=18). Por tanto, se realizó el estudio de supervivencia incluyendo a 293 pacientes, de los que 95 fueron casos de HCC.

## 7.1 Supervivencia global

La supervivencia global de la población de nuestro estudio fue de 62,5% a 15 años. La media de supervivencia de la población fue de 9,9 años (IC 95% 9,1-10,6 años). Al analizar la supervivencia atendiendo a la etiología de la enfermedad hepática, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes que recibieron trasplante hepático por cirrosis VHC y por cirrosis alcohólica (p=0,39). Los datos se resumen en la figura 13.

	Todos los pacientes n=293	VHC n=192	Alcohol n=101	p
Supervivencia [X±DE], años	9,89 ± 0,38	9,6 ± 0,47	10,3 ± 0,63	0,39
Supervivencia a 15 años (%)	62,5%	60,4%	66,3%	

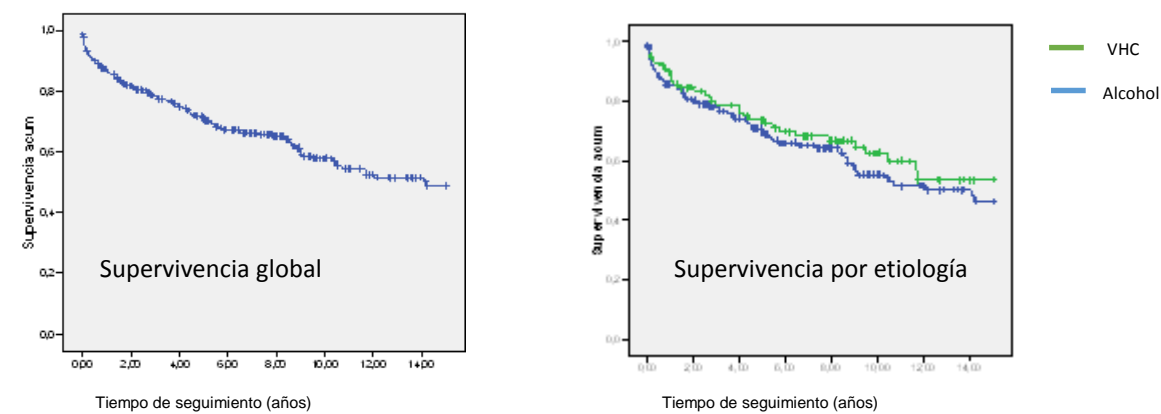


Figura 13: Funciones de supervivencia global (izquierda) y por etiología (derecha).

## 7.2 Influencia del HCC en la supervivencia

Para el estudio del potencial impacto en la supervivencia de recibir un trasplante hepático por HCC frente a ser trasplantado por cirrosis, se analizó la supervivencia de los pacientes con HCC (n=95) y con cirrosis sin HCC (n=198), tanto en la población global como por etiología. La supervivencia fue similar (p=0,82) en los pacientes trasplantados por cirrosis sin HCC (60,6% a los 15 años) que en los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC (66,3% a los 15 años), como se muestra en la figura 14. Se obtuvieron los mismos resultados al realizar el análisis por subgrupos en función de la etiología (figura 15). La presencia de HCC no influyó en la supervivencia en nuestra serie.

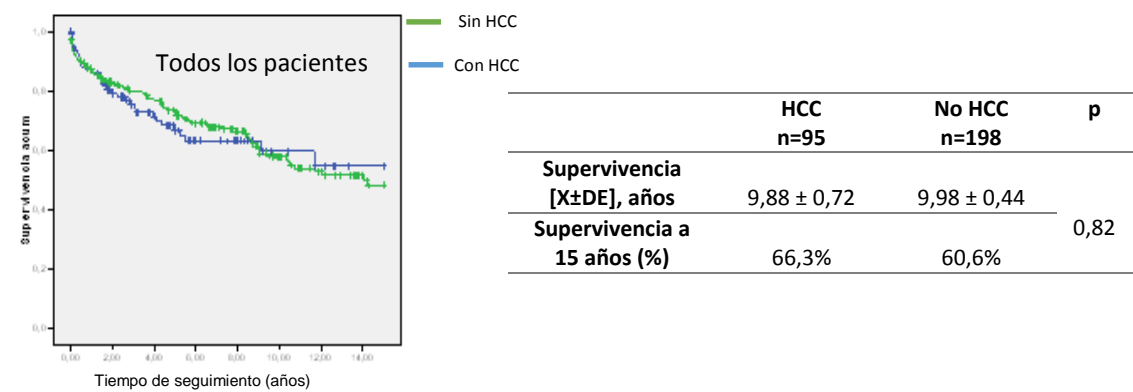


Figura 14: Funciones de supervivencia en función de la presencia de HCC en toda la población del estudio.

	VHC (n=192)			Alcohol (n=101)		
	Con HCC (n=76)	Sin HCC (n=116)	p	Con HCC (n=19)	Sin HCC (n=82)	p
Supervivencia [X±DE], años	9,5 ± 0,83	9,9 ± 0,56	0,62	11,4 ± 1,34	10,1 ± 0,71	0,46
Supervivencia a 15 años	64,5%	57,8%		73,7%	64,6%	

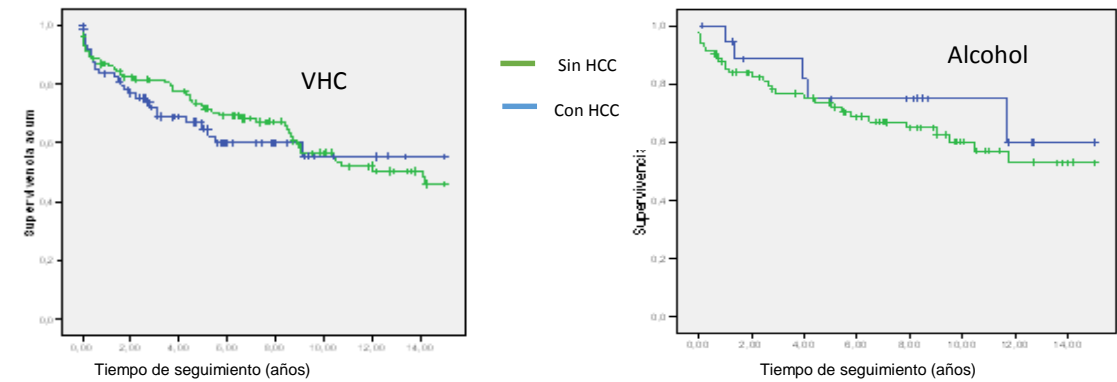


Figura 15: Funciones de supervivencia en función de la presencia de HCC en los pacientes con VHC (izquierda) y con cirrosis alcohólica (derecha).

### 7.3 Factores relacionados con la supervivencia en pacientes con HCC

Se estudió la supervivencia en los 95 pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC (76 asociados a VHC y 19 asociados a cirrosis alcohólica), en función de las siguientes variables:

#### 7.3.1 Etiología

Se observó una menor supervivencia en los pacientes trasplantados por HCC asociado a VHC que en los pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica, sin que las diferencias sean estadísticamente significativas ( $p=0,33$ ) (figura 16).

	Todos los HCC n=95	HCC-VHC n=76	HCC-Alcohol n=19	p
Supervivencia [ $X \pm DE$ ], años	9,88 $\pm$ 0,72	9,56 $\pm$ 0,82	11,42 $\pm$ 1,34	0,33
Supervivencia a 15 años (%)	66,3%	64,5%	73,7%	

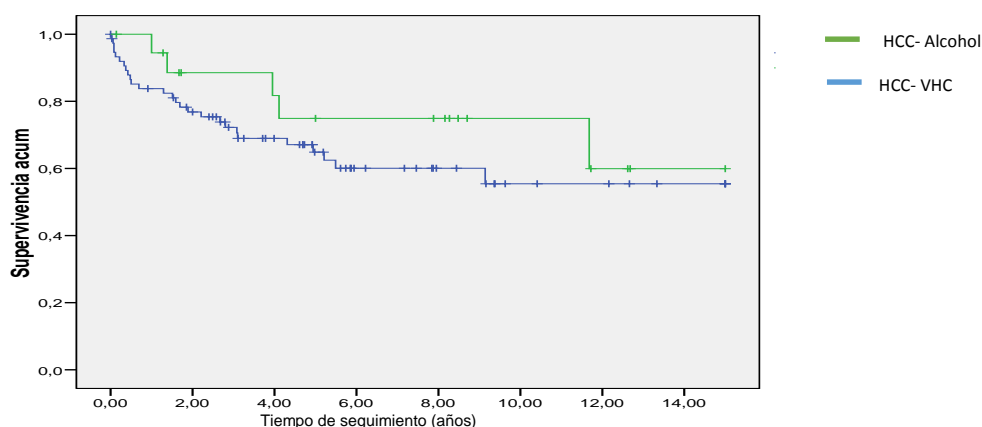


Figura 16: Funciones de supervivencia en los pacientes con HCC, en función de la etiología de la cirrosis

#### 7.3.2 Criterios de Milan

Se compararon las curvas de supervivencia de los pacientes trasplantados por HCC que cumplían los criterios de Milan tras el estudio anatomopatológico del explante ( $n=54$ ), y los que los excedieron ( $n=36$ ). Los criterios de Milan se analizaron *a posteriori*, por lo que se incluyeron todos los pacientes, independientemente de la fecha del trasplante. En 5 pacientes no fue posible este análisis por necrosis del tumor como resultado de tratamiento durante la estancia del paciente en lista de espera de trasplante. Los resultados se muestran en la figura 17.

Al realizar el análisis estadístico comparando la supervivencia a los 15 años entre los pacientes con tumores que cumplen los criterios de Milan y los pacientes cuyos tumores los exceden, no se observan diferencias significativas ( $p=0,35$ ). Sin embargo, al observar las funciones de supervivencia, en los pacientes cuyos tumores exceden Milan la supervivencia es inferior que la de los pacientes en los que el HCC está dentro de los criterios; esta diferencia es particularmente relevante hasta los 8 años, momento en el que las curvas de supervivencia confluyen. A los 5 años, se observa una tendencia estadística ( $p=0,09$ ) hacia que los pacientes con tumores que cumplen los criterios de Milan presenten una mejor supervivencia (figura 17).

	HCC dentro de los criterios de Milan (n=54)*	HCC fuera de los criterios de Milan (n=36)*	p
Supervivencia [ $X \pm DE$ ], años	10,11 $\pm$ 0,93	8,9 $\pm$ 1,22	0,35
Supervivencia a 15 años (%)	68,5%	61,1%	

\*datos del explante valorables en 90/95 pacientes

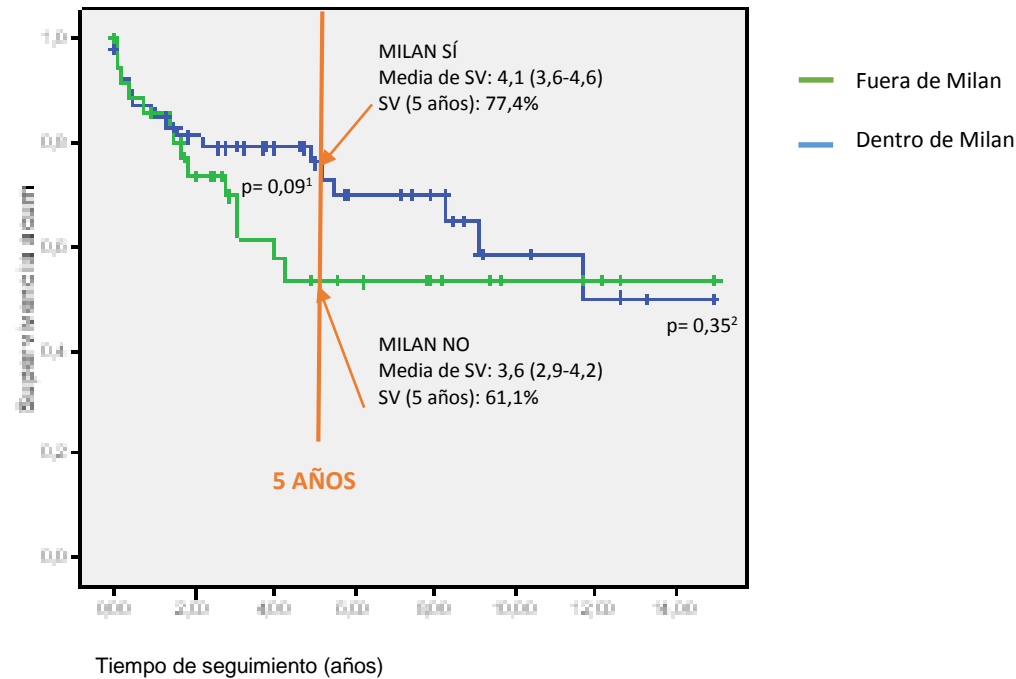


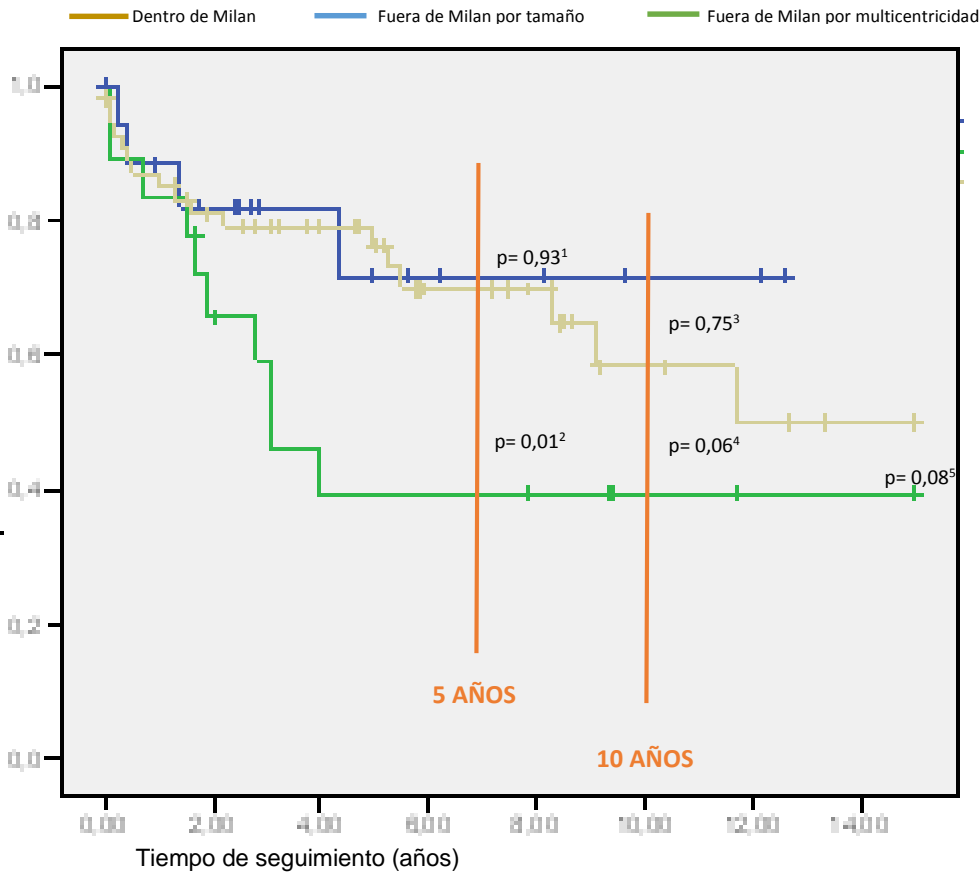
Figura 17: Funciones de supervivencia en función de la adecuación a los criterios de Milan.

<sup>1</sup>diferencia en la supervivencia a 5 años; <sup>2</sup>diferencia en la supervivencia a 15 años. SV: supervivencia.

Posteriormente, se realizó un análisis para explorar si superar los criterios de Milan por tamaño tiene la misma repercusión en la supervivencia que excederlos por multicentricidad, o por el contrario impactan de forma diferente en la evolución postraplante (figura 18). Los datos se censuraron para el análisis a los 5, 10 y 15 años.

	HCC dentro de Milan (n=54)	HCC fuera de Milan por tamaño (n=18)	p <sup>1</sup>	HCC fuera de Milan por multicentricidad (n=18)	p <sup>2</sup>
<b>Supervivencia [X±DE], años</b>	4,1 ± 0,41	4,1 ± 0,25	0,93	3,17 ± 0,43	<b>0,01</b>
<b>Supervivencia a 5 años (%)</b>	77,4%	77,8%		44,4%	
<b>Supervivencia [X±DE], años</b>	7,5 ± 0,54	7,7 ± 0,98	0,75	5,1 ± 0,99	0,06
<b>Supervivencia a 10 años (%)</b>	70,4%	77,8%		44,4%	
<b>Supervivencia [X±DE], años</b>	10,11 ± 0,93	9,6 ± 1,3	0,67	7,1 ± 1,6	0,08
<b>Supervivencia a 15 años (%)</b>	68,5%	77,8%		44,4%	

<sup>1</sup>Compara HCC dentro de Milan y fuera de Milan por tamaño; <sup>2</sup>compara HCC dentro de Milan y fuera de Milan por multicentricidad.



**Figura 18:** Funciones de supervivencia en función de la adecuación a los criterios de Milan, separados por tamaño y multicentricidad.

Valor de p: compara supervivencia a 5 años de tumores que cumplen criterios de Milan con tumores que exceden Milan por tamaño (1) y por multicentricidad (2); compara supervivencia a 10 años de tumores que cumplen criterios de Milan con tumores que exceden Milan por tamaño (3) y por multicentricidad (4); Compara supervivencia a 15 años de tumores que cumplen Milan con tumores que exceden Milan por multicentricidad.



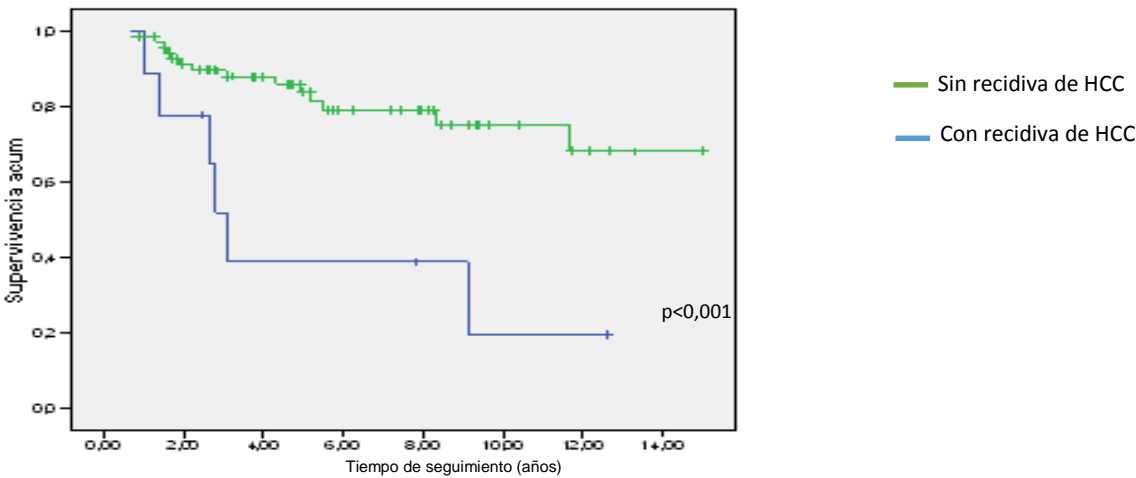
A los 15 años, los pacientes que exceden los criterios de Milan por multicentricidad presentan una supervivencia más baja que los pacientes que los superan por tamaño, ( $p=0,08$ ), los cuales presentan una curva de supervivencia prácticamente superponible a los pacientes que cumplen los criterios de Milan ( $p=0,67$ ) en el análisis del explante. Esta diferencia en la supervivencia es particularmente importante al analizar los datos a 5 años del trasplante, observando que los pacientes que exceden los criterios de Milan por multicentricidad presentan una tasa de supervivencia significativamente inferior a la de los pacientes que cumplen los criterios de Milan o que los superan por tamaño ( $p=0,01$ ). Las diferencias en la supervivencia se van haciendo menores a lo largo del tiempo.

No se realizó el análisis de la supervivencia según la presencia de invasión vascular por el número insuficiente de casos.

### 7.3.3 Recidiva de HCC postrasplante

Se comparó la supervivencia actuarial entre los pacientes que presentan recidiva del HCC ( $n=9$ ), y los pacientes que no presentan recidiva de la enfermedad ( $n=71$ ), como se muestra en la figura 19. Los pacientes en los que se produce recidiva del HCC presentan menor supervivencia que los pacientes sin recidiva ( $p<0,001$ ), diferencia que se observa desde el primer año postrasplante y se mantiene durante toda la evolución.

	HCC sin recidiva (n=71)	HCC con recidiva (n=9)	p
<b>Supervivencia [<math>X \pm DE</math>], años</b>	$12 \pm 1,6$	$5,6 \pm 0,69$	<b>&lt;0,001</b>
<b>Supervivencia media (15 años)</b>	80,3%	33,3%	



**Figura 19:** funciones de supervivencia en función de la recidiva del HCC

### 7.3.4 Polimorfismos genéticos

Por último, se realizó un análisis con la intención de estudiar la influencia de los polimorfismos de *IL28B* y *TLRs* en la supervivencia de los pacientes con HCC a los 15 años postrasplante. Los resultados se muestran en la tabla 28.

**Tabla 28:** influencia de la distribución genotípica de los polimorfismos analizados en la supervivencia postrasplante de los pacientes con HCC.

Polimorfismo		Pacientes con HCC n/N* (%) Media SV $\pm$ DE	p <sup>1</sup>
<b><i>IL28B</i></b> <i>rs12979860 C/T</i>	CC	27/33 (81,8%): <b>12,3 <math>\pm</math> 0,9</b>	<b>0,01</b>
	CT	25/47 (53,2%): <b>7,8 <math>\pm</math> 1</b>	
	TT	11/15 (73,3%): <b>9,6 <math>\pm</math> 1,2</b>	
<b><i>TLR3</i></b> <i>Leu412Phe</i>	CC	25/39 (64,1%): 9,7 $\pm$ 1,1	0,57
	CT	30/46 (65,2%): 9,6 $\pm$ 1	
	TT	8/10 (80%): 12,2 $\pm$ 1,7	
<b><i>TLR4</i></b> <i>Asp299Gly</i>	AA	58/87 (66,7%): 9,9 $\pm$ 0,7	0,84
	AG	5/8 (62,5%): 8,8 $\pm$ 1,3	
<b><i>TLR7</i></b> <i>Glu11Leu (varones*)</i> (n=229)	A	44/65 (67,7%): 9,9 $\pm$ 0,9	0,86
	T	9/13 (69,2%): 9,2 $\pm$ 1,4	
<b><i>TLR8</i></b> <i>Met1Val (varones*)</i> (n=228)	A	43/56 (76,8%): <b>11,4 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>0,01</b>
	G	10/22 (45,5%): <b>7,2 <math>\pm</math> 1,4</b>	
<b><i>TLR9</i></b> <i>-1237T&gt;C</i>	CC+CT	9/19 (47,4%): <b>7,2 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>0,03</b>
	TT	54/76 (71,1%): <b>10,6 <math>\pm</math> 0,8</b>	
<b><i>TLR9</i></b> <i>-1486T&gt;C</i>	CC	9/14 (64,3%): 9,6 $\pm$ 1,8	0,28
	CT	34/46 (73,9%): 10,9 $\pm$ 1	
	TT	20/35 (57,1%): 8,7 $\pm$ 1,2	

SV: supervivencia. \*n=número de pacientes vivos a los 15 años; N= número de pacientes portadores del genotipo indicado. P calculada mediante comparación de curvas de supervivencia con la prueba de Log Rank para diferentes genotipos ajustado a la presencia de HCC.

Los polimorfismos que se encontraron asociados con la supervivencia de los pacientes que recibieron trasplante hepático bajo la indicación de HCC fueron:

a. Polimorfismo rs12979860 C/T de *IL28B*

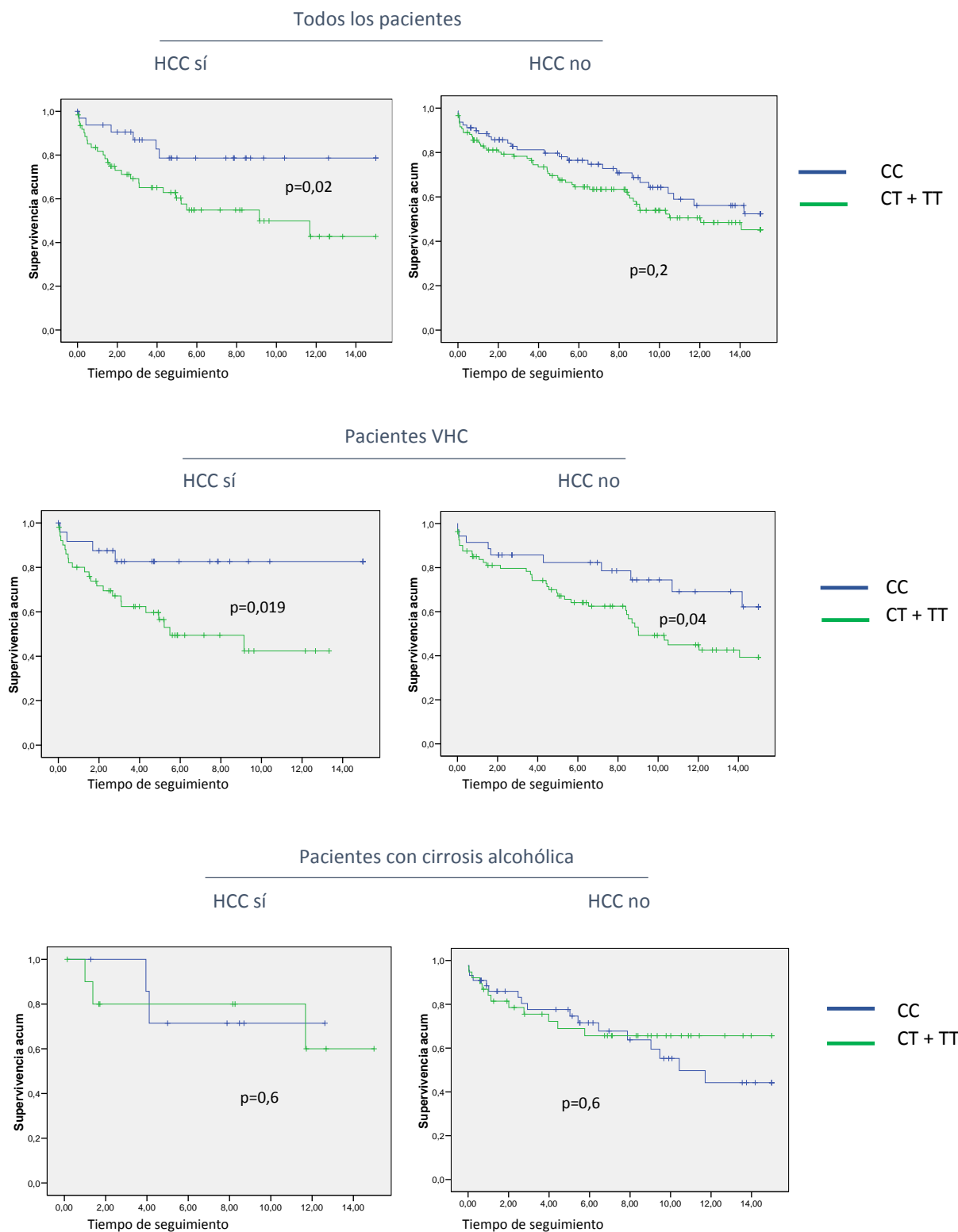
La supervivencia de los pacientes con HCC es diferente en función del genotipo de *IL28B* ( $p=0,01$ ), como se muestra en la tabla 28; en concreto, los pacientes portadores del alelo mutado (genotipos CT y TT) en el polimorfismo analizado presentan menor supervivencia que los pacientes con genotipo salvaje (CC) (CC: 81,8% vs CT+TT: 58,1%;  $p=0,02$ ). Al realizar este análisis en los pacientes que recibieron trasplante por cirrosis sin HCC, incluyendo tanto los pacientes con cirrosis VHC como los pacientes con cirrosis alcohólica, no se observan diferencias en la supervivencia en función del polimorfismo de *IL28B* ( $p=0,2$ ) (tabla 29 y figura 20).

Tabla 29: influencia del polimorfismo de *IL28B* en la supervivencia postrasplante en función de la presencia de HCC

Polimorfismo		Todos los pacientes			
		HCC SI n/N* (%) Media SV $\pm$ DE	p	HCC NO n/N* (%) Media SV $\pm$ DE	p
<i>IL28B</i> rs12979860 C/T	CC CT+TT	27/33 (81,8%): 12,3 $\pm$ 0,9 36/62 (58,1%): 8,6 $\pm$ 0,9	<b>0,02</b>	52/79 (65,8%): 10,7 $\pm$ 0,7 68/119 (57,1%): 9,5 $\pm$ 0,6	0,2
				<b>0,02</b>	

\*n=número de pacientes vivos a los 15 años; N= número de pacientes portadores del genotipo indicado. \*\*Muestra la comparación entre los pacientes cirróticos con y sin HCC.  
p calculada mediante la prueba de Log Rank.

Debido a que la distribución genotípica de este polimorfismo es diferente entre los pacientes con cirrosis por VHC y los pacientes con cirrosis alcohólica, se analizó la influencia del genotipo CC sobre la supervivencia en función de la etiología que motivó el trasplante (figura 20). En el subgrupo de pacientes con cirrosis VHC, los pacientes con el genotipo CC presentan mayor supervivencia que los portadores de los genotipos CT y TT; esta diferencia se observa tanto en los pacientes con HCC ( $p=0,02$ ) como en los pacientes con cirrosis sin HCC ( $p=0,04$ ). Por tanto, ser portador de genotipos diferentes del ancestral en el gen de la *IL28B* impacta de forma negativa en la supervivencia de los pacientes que reciben trasplante por enfermedad relacionada con VHC, independientemente de la presencia de HCC. En los pacientes con cirrosis enólica, no se observó diferencia significativa en la supervivencia de los pacientes en función del genotipo en el polimorfismo de *IL28B*, ni en los pacientes con HCC ( $p=0,6$ ) ni en los paciente con cirrosis ( $p=0,6$ ).



**Figura 20:** Funciones de supervivencia en función del polimorfismo de *IL28B* en todos los pacientes (parte superior), en los pacientes con VHC (parte central), y en los pacientes con cirrosis alcohólica (parte inferior).

## b. Polimorfismos de *TLR8*

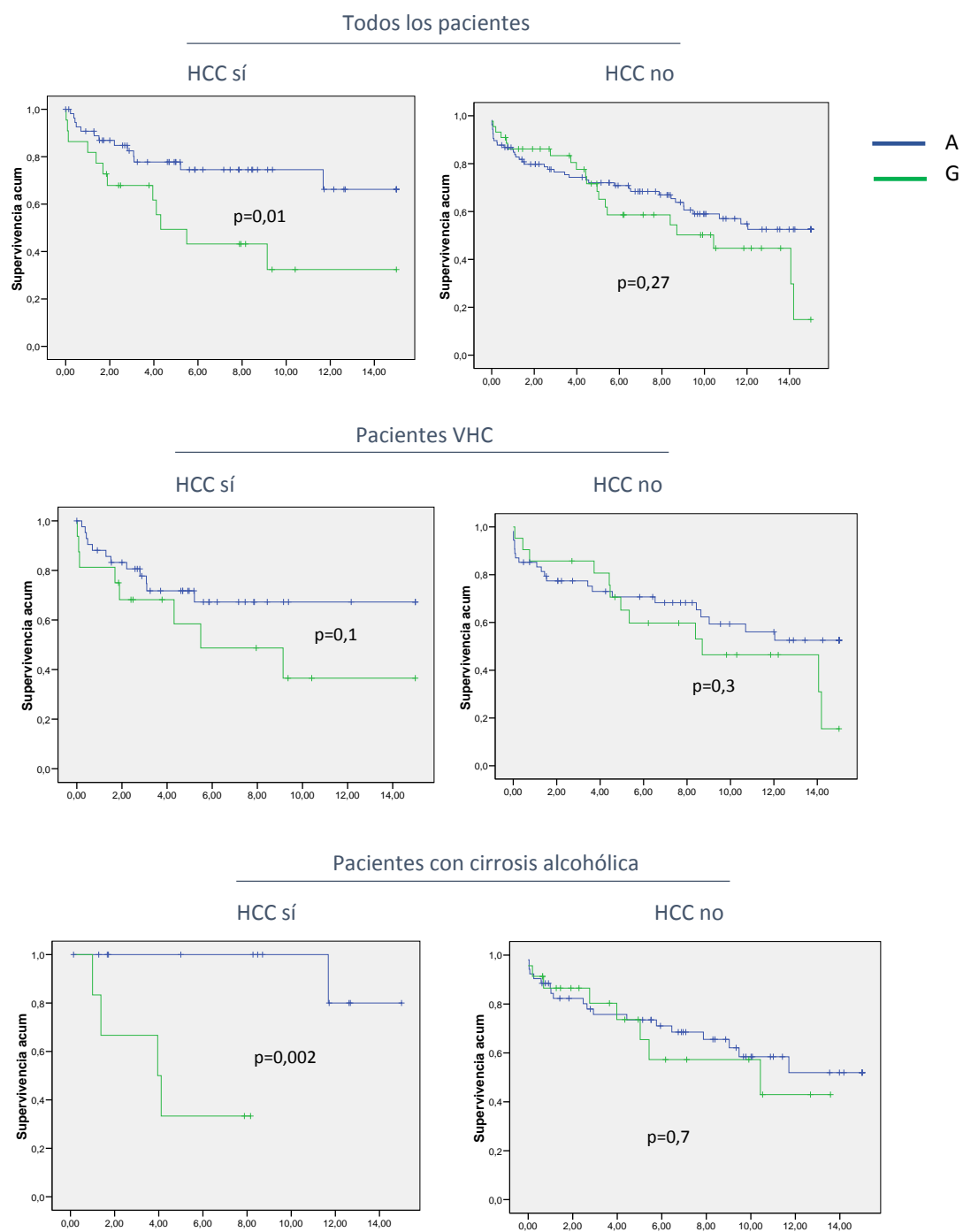
Al analizar las diferencias en la supervivencia de los pacientes en función del polimorfismo Met1Val de *TLR8*, se observa que los pacientes varones con HCC portadores del alelo variante G sobreviven menos que los pacientes con genotipo salvaje (alelo A: 76,8% vs alelo G: 54,5%;  $p=0,01$ ), diferencia no observada en los pacientes con cirrosis sin HCC ( $p=0,27$ ) (tabla 30).

**Tabla 30:** influencia del polimorfismo de *TLR8* en la supervivencia postrasplante en función de la presencia de HCC

Polimorfismo		Todos los pacientes				
		HCC SI n/N* (%): Media SV $\pm$ DE	p	HCC NO n/N* (%): Media SV $\pm$ DE	P	p**
<b><i>TLR8</i></b> <i>Met1Val (varones)</i> (n=228)	A	43/56 (76,8%): 11,4 $\pm$ 0,8	<b>0,01</b>	66/106 (62,3%): 10 $\pm$ 0,6	0,27	<b>0,02</b>
	G	10/22 (45,5%): 7,2 $\pm$ 1,4		24/44 (54,5%): 9 $\pm$ 0,9		

\*n=número de pacientes vivos a los 15 años; N= número de pacientes portadores del genotipo indicado. \*\*Muestra la comparación entre los pacientes cirróticos con y sin HCC. p calculada mediante la prueba de Log Rank.

Las diferencias se mantienen al realizar el mismo análisis en los pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica ( $p=0,002$ ), pero sólo alcanza una tendencia estadística en los pacientes con HCC asociado a VHC ( $p=0,1$ ) (figura 21). La diferencia de supervivencia observada en los pacientes con HCC no se evidencia en los pacientes trasplantados por cirrosis sin HCC, ni en los pacientes con cirrosis VHC ( $p=0,3$ ) ni en los pacientes con cirrosis alcohólica ( $p=0,7$ ).



**Figura 21:** Funciones de supervivencia de los pacientes con HCC (izquierda) y con cirrosis sin HCC (derecha), en todos los pacientes (fila superior), en los pacientes con cirrosis VHC (fila central) y en los pacientes con cirrosis alcohólica (fila inferior), en función del polimorfismo de *TLR8*.

### c. Polimorfismos de *TLR9*

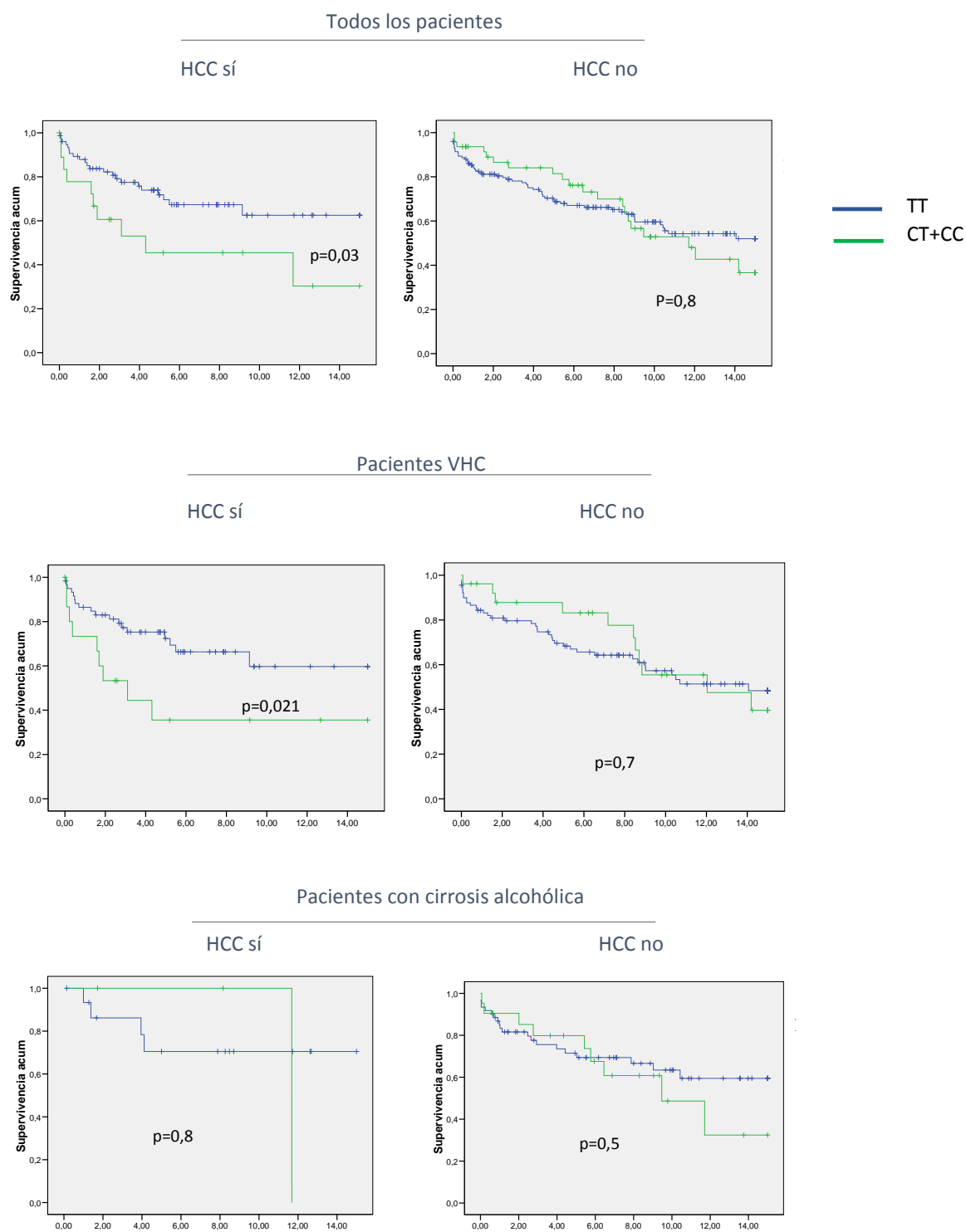
El polimorfismo -1237T>C se relacionó con la supervivencia postrasplante de los pacientes trasplantados por HCC (tabla 31). Los pacientes con HCC portadores del alelo C presentaban menor supervivencia que los pacientes con genotipo ancestral ( $p=0,032$ ); esta diferencia de supervivencia no se observó en los pacientes que recibieron trasplante hepático por cirrosis sin HCC ( $p=0,8$ ).

**Tabla 31:** influencia del polimorfismo de -1237T>C de *TLR9* en la supervivencia postrasplante en función de la presencia de HCC

Polimorfismo		Todos los pacientes				p**
		HCC SI n/N* (%): Media SV $\pm$ DE	p	HCC NO n/N* (%): Media SV $\pm$ DE	P	
<b><i>TLR9</i></b> -1237T>C	CC+CT TT	9/19 (47,4%): 7,2 $\pm$ 1,6 54/76 (71,1%): 10,6 $\pm$ 0,8	<b>0,03</b>	27/47 (57,4%): 10,1 $\pm$ 0,8 93/151 (61,6%): 9,9 $\pm$ 0,5	0,8	<b>0,03</b>

\*n=número de pacientes vivos a los 15 años; N= número de pacientes portadores del genotipo indicado. \*\*Muestra la comparación entre los pacientes cirróticos con y sin HCC. p calculada mediante la prueba de Log Rank.

Esta disminución en la supervivencia sólo se mantuvo en los pacientes trasplantados por cirrosis VHC con HCC ( $p=0,02$ ), no siendo observada en los pacientes con cirrosis VHC sin HCC ( $p=0,7$ ). En los pacientes con cirrosis alcohólica, no se alcanzó la significación estadística al comparar la supervivencia de los pacientes con HCC ( $p=0,8$ ) ni la de los pacientes sin HCC ( $p=0,5$ ) en función de su genotipo en el polimorfismo -1237T>C de *TLR9* (figura 22).



**Figura 22:** Funciones de supervivencia de los varones con HCC (izquierda) y con cirrosis sin HCC (derecha), en todos los pacientes (fila superior), en los pacientes con cirrosis VHC (fila central), y en los pacientes con cirrosis alcohólica (fila inferior), en función del polimorfismo -1237T>C de *TLR9*. En los pacientes con cirrosis enólica no se observaron diferencias significativas en la supervivencia.



---

## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

---

Se incluyeron en el estudio 311 pacientes que recibieron trasplante hepático, 202 por cirrosis VHC y 109 por cirrosis alcohólica en nuestro centro durante el periodo comprendido entre enero de 1988 y diciembre de 2013. De ellos, en 100 pacientes se confirmó la presencia de HCC en el explante, 79 asociados a cirrosis VHC y 21 sobre cirrosis alcohólica.

### *8.1 Estudio comparativo de los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica*

Los pacientes con cirrosis VHC presentaron mayor edad al trasplante ( $p=0,01$ ), y fueron con menos frecuencia varones ( $p<0,001$ ) que los pacientes con cirrosis alcohólica. En los pacientes con trasplante hepático por cirrosis VHC, el genotipo viral más frecuente fue el genotipo 1 (88,6%), concretamente el subtipo 1b. Los pacientes con genotipo 1 del VHC recibieron el trasplante hepático a mayor edad que los pacientes con genotipo no-1 ( $p=0,02$ ), que tenían una edad al trasplante similar a la de los pacientes trasplantados por cirrosis alcohólica.

El genotipo TT del polimorfismo rs12979860 de *IL28B* fue más frecuente en los pacientes con enfermedad relacionada con VHC, independientemente del genotipo viral, que en los pacientes con cirrosis alcohólica [TT vs CT + CC:  $p < 0,001$ ; OR 7,32; IC 95% 2,15 - 24,92]. El genotipo CC fue menos frecuente en los pacientes con infección por el genotipo 1 del VHC que en los pacientes infectados por genotipos no-1 del VHC [CC vs CT+TT:  $p=0,009$ ; OR 0,26; IC 95% 0,1 – 0,69] y que en los pacientes con cirrosis alcohólica [CC vs CT+TT:  $p<0,001$ ; OR 0,56; IC 95% 0,41 – 0,77].

La distribución genotípica del polimorfismo Glu11Leu de *TLR7*, localizado en el cromosoma X, fue distinta entre los varones con cirrosis VHC y con cirrosis alcohólica. El alelo A fue más frecuente en los varones con cirrosis VHC que en los varones con cirrosis alcohólica ( $p=0,02$ ; OR 2,21; IC 95% 1,17 – 4,17), sin observar diferencias respecto al genotipo viral en los pacientes con infección por VHC.

En el análisis combinado de los polimorfismos que alcanzaron la significación estadística (genotipo TT de la *IL28B* y del alelo A de *TLR7* Glu11Leu en varones), la fuerza de la asociación con cirrosis VHC fue mayor cuando ambos genotipos se presentan de forma simultánea que si se analiza cada polimorfismo por separado.

### *8.2 Hepatocarcinoma*

La incidencia de HCC fue mayor entre los pacientes con cirrosis por VHC que en los pacientes con cirrosis alcohólica (OR 2,7; IC 95% 1,5-4,7;  $p=0,001$ ). No hubo diferencias en la incidencia de HCC en los pacientes con VHC respecto al genotipo viral.

Todos los pacientes con HCC que recibieron trasplante hepático después de 1997 cumplían los criterios de Milán en el estudio pretrasplante, utilizando las técnicas de imagen habituales en la práctica clínica; sin embargo, en torno al 40% de los HCC excedían los criterios de Milán en el estudio anatomopatológico del explante. Los pacientes trasplantados con 2 o 3 nódulos de HCC excedieron con mayor frecuencia los criterios de Milán que los pacientes con nódulo único. En el 11% de los pacientes con HCC asociado a VHC, y en el 17,6% de los pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica se objetivó invasión vascular en el análisis histológico del hígado explantado, sin evidencia de la misma en el estudio de imagen pretrasplante.

### 8.2.1 Variables relacionadas con el desarrollo de HCC

Los pacientes con HCC tenían mayor edad al trasplante que los pacientes sin HCC ( $p=0,007$  para el HCC asociado a cirrosis VHC;  $p=0,03$  para el HCC asociado a cirrosis alcohólica), y eran con más frecuencia varones, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística para ninguna de las dos etiologías. No se observó relación de ninguno de los polimorfismos analizados con el desarrollo de HCC.

### 8.2.2 Recidiva de HCC postrasplante

Se observaron 10 casos de recidiva de HCC postrasplante (12,36%), sin diferencias en función de la etiología ( $p=0,43$ ). El tiempo medio hasta la recidiva fue de  $58 \pm 38,3$  meses. No se observaron casos de HCC de novo.

En el análisis univariante, fueron factores asociados a la recidiva del HCC postrasplante superar los criterios de Milan en el estudio anatomopatológico del explante (OR 6,41; IC 95% 1,23 – 33,3;  $p=0,026$ ), la presencia de invasión microvascular en el explante (OR 10,15; IC 95% 1,6 – 61,9;  $p=0,02$ ) y, por último, ser portador del genotipo CT en el polimorfismo -1486C/T de *TLR9* (OR 10.36 IC 95% 1,25-86,17;  $p=0,015$ ). No se observó relación de la recidiva con ninguna variable demográfica ni clínica de las analizadas.

En el análisis multivariante, el genotipo CT polimorfismo 1486C/T de *TLR9* (OR 18,2; IC 95% 1,21-250;  $p=0,03$ ), la presencia de invasión vascular (OR 17,5; IC 95% 1,4-250;  $p=0,02$ ) y exceder los criterios de Milan en el análisis anatomopatológico del explante (OR 6,5; IC 95% 1,1-41,9;  $p=0,04$ ) se demostraron factores independientes de riesgo de recidiva del HCC postrasplante.

### 8.3 Estudio de la supervivencia

La supervivencia global de la población de nuestro estudio fue de 62,5% a 15 años, con una media de supervivencia de 9,9 años (IC 95% 9,1-10,6 años), sin diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica ( $p=0,39$ ).

La supervivencia fue similar en los pacientes trasplantados por cirrosis sin HCC que en los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC ( $p=0,82$ ), una vez más sin encontrar diferencias en función de la etiología.

En los pacientes con HCC, aquellos que exceden los criterios de Milan por multicentricidad presentan una menor supervivencia a los 5 años del trasplante que los pacientes que los superan por tamaño ( $p=0,01$ ), los cuales presentan una curva de supervivencia prácticamente superponible a los pacientes que cumplen los criterios de Milan ( $p=0,67$ ).

Los pacientes en los que se produce recidiva del HCC después del trasplante, presentan menor supervivencia que los pacientes sin recidiva ( $p<0,001$ ), diferencia que se observa desde el primer año postrasplante y se mantiene durante toda la evolución. Los pacientes con cirrosis VHC portadores del genotipo ancestral en el polimorfismo rs12979860 de *IL28B* (CC: 81,8% vs CT+TT: 58,1%;  $p=0,021$ ) muestran mayor supervivencia postrasplante, independientemente de la presencia de HCC en el explante.

Entre los pacientes con HCC, los pacientes portadores del alelo mutado en el polimorfismo -1237T>C de *TLR9* (TT: 71,3% vs CT+CC: 47,4%;  $p=0,003$ ), así como los varones con el alelo variante G en el polimorfismo Met1Val de *TLR8* (alelo A: 76,8% vs alelo G: 54,5%;  $p=0,01$ ), presentan menor supervivencia que los portadores de los respectivos genotipos ancestrales. Estas diferencias en la supervivencia respecto a dichos polimorfismos no se observan en los pacientes trasplantados por cirrosis sin HCC.

Por tanto, son factores relacionados con la supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático por HCC la presencia de más de 4 nódulos tumorales, la recidiva del HCC postrasplante y ser portador de variantes no comunes en los polimorfismos Met1Val de *TLR8* y -1237T>C de *TLR9*. La propia presencia de HCC, la etiología de la cirrosis y superar los criterios de Milan por tamaño no se mostraron asociados a la supervivencia de los pacientes con HCC.

---

## 5. DISCUSIÓN

---

### ÍNDICE DE LA DISCUSIÓN

1. Características de la población	91
2. Estudio comparativo de la distribución genotípica de los pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica	93
2.1 Polimorfismos de <i>IL28B</i>	93
2.2 Polimorfismos de <i>TLRs</i>	94
3. Estudio anatomopatológico de los HCC	97
4. Factores relacionados con el desarrollo y el pronóstico del HCC	101
4.1 Factores relacionados con el desarrollo de HCC	103
4.2 Factores relacionados con el pronóstico del HCC postrasplante	109
5. Limitaciones	117
6. Implicaciones, aplicabilidad y contribución	119

---

---

# 1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

---

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la asociación de varios polimorfismos en genes de la inmunidad natural con el desarrollo de HCC y su evolución postrasplante. Para ello, se ha incluido una población total de 311 pacientes que recibieron un primer trasplante hepático por cirrosis asociada a VHC o cirrosis alcohólica, 100 de ellos bajo la indicación de HCC. Se trata por tanto de una serie amplia, si tenemos en cuenta que es un estudio unicéntrico. Aunque podría haberse aumentado el tamaño muestral incluyendo pacientes con los diagnósticos estudiados no sometidos a trasplante hepático, se eligió la cohorte de pacientes trasplantados por dos motivos fundamentales: por un lado, para asegurar el diagnóstico histológico tras el estudio anatomopatológico del explante, tanto de cirrosis como de HCC; por otro, para garantizar que los pacientes con cirrosis sin HCC estuvieran en fase terminal de la enfermedad.

Se han analizado dos cohortes de pacientes bien diferenciadas: la primera, que incluyó pacientes con enfermedad hepática terminal por infección crónica por VHC, se eligió para el estudio de la influencia de los diferentes polimorfismos analizados en el desarrollo y la evolución del HCC, siendo ya conocida la repercusión de las variaciones genéticas de dichos polimorfismos en la evolución de la enfermedad hepática por VHC. La segunda cohorte, compuesta por pacientes que recibieron trasplante hepático por cirrosis alcohólica con y sin HCC, fue seleccionada para evaluar el impacto de los distintos polimorfismos en el desarrollo y el pronóstico del HCC, independientemente del efecto en la enfermedad de base. La infección crónica por VHC y el alcohol son, además, las dos primeras causas de cirrosis en nuestro medio, y las dos etiologías principales de HCC, lo que ha permitido reclutar un número suficiente de pacientes. Para facilitar la interpretación de los resultados, han sido excluidos del trabajo todos los pacientes en los que se reconociera algún factor de riesgo conocido de HCC adicional a la cirrosis por VHC o alcohólica, como la coinfección VHB o VIH, o el tratamiento inmunosupresor previo al trasplante.

La población de estudio supone casi un 70% del total de los trasplantes hepáticos realizados en el HUPHM bajo las indicaciones elegidas, por lo que se puede considerar representativa de la población diana. Sin embargo, es necesario señalar que la exclusión de pacientes por no disponer de muestra de ADN, que fue la causa por la que se excluyó al mayor número de pacientes (24%), podría haber conllevado un sesgo de selección que influya en los resultados. Esto fue particularmente importante en la cohorte de pacientes que recibieron trasplante hepático por cirrosis alcohólica, en la que la proporción de pacientes excluidos por este motivo alcanzó el 35%. En la práctica totalidad de estos casos, los pacientes habían fallecido antes del inicio del trabajo; en

muy pocas ocasiones se excluyeron pacientes por pérdida de seguimiento. En consecuencia, aunque se disponía en el Biobanco de muestras de ADN de muchos de los pacientes fallecidos, la omisión de los pacientes de los que no se pudo obtener muestra de sangre para el análisis de los polimorfismos antes del fallecimiento pudo haber infraestimado el efecto de los mismos en los análisis realizados, y alterar los resultados del trabajo, especialmente en el estudio de la supervivencia.

Las características demográficas de los pacientes incluidos en este estudio son similares a las descritas en otras series, y a las recogidas en los distintos registros de trasplante, tanto nacionales como internacionales. Tal y como se recoge en la última memoria del Registro Español de Trasplante Hepático (RETH), con los datos actualizados hasta 2014<sup>130</sup>, más de la mitad de los trasplantes se realizan a pacientes de entre 40 y 59 años, similar a la media de edad al trasplante en nuestra cohorte (54,4 años en los pacientes con cirrosis VHC y 51.7 años en los pacientes con cirrosis alcohólica). Aproximadamente las tres cuartas partes de los receptores de trasplante hepático son varones, proporción similar a la observada en nuestra serie. En la cohorte de pacientes con cirrosis alcohólica se observó un predominio del sexo masculino, acorde también a lo descrito en dichos registros.

La asociación entre la enfermedad crónica por VHC y el desarrollo de DM, que se produce a través de un aumento en la resistencia a la insulina es bien conocida<sup>131</sup>. Esta asociación cobra particular importancia, puesto que la propia resistencia a la insulina, a su vez, aumenta la velocidad de progresión de la fibrosis en los pacientes con infección crónica por VHC<sup>132-133</sup>. De forma interesante, recientemente ha sido comunicada por nuestro grupo la relación entre los polimorfismos genéticos en el gen de la *IL28B* con el desarrollo de DM postrasplante<sup>134</sup>, lo que sugiere la relación entre la susceptibilidad genética a padecer formas más agresivas de enfermedad hepática y el riesgo de desarrollo de diabetes; estos datos han sido confirmados en otros trabajos<sup>135</sup>. En nuestra serie, se ha encontrado una sobrerrepresentación de los genotipos desfavorables de *IL28B* en los pacientes con cirrosis VHC con y sin HCC, pero no hubo diferencias en la prevalencia de diabetes pretrasplante entre los pacientes con cirrosis por VHC y los pacientes con cirrosis alcohólica.

Casi un tercio de todos los trasplantes hepáticos efectuados en nuestro país se indican por HCC, con una clara tendencia al alza si observamos la evolución en el tiempo<sup>130</sup>. En nuestro estudio, las indicaciones de trasplante hepático por HCC reflejan la proporción del registro nacional<sup>130</sup>, constituyendo el 32% de las mismas, con claras diferencias en función de la etiología: aproximadamente un 40% de los pacientes con enfermedad relacionada con VHC presentaron HCC en el explante, frente al 20% de los pacientes con cirrosis enólica.

---

## 2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA DE LOS PACIENTES CON CIRROSIS VHC Y CIRROSIS ALCOHÓLICA

---

Con el fin de analizar la influencia de diferentes polimorfismos genéticos de la inmunidad innata en el desarrollo y la evolución postrasplante del HCC en pacientes con cirrosis VHC y cirrosis alcohólica se realizó, en primer lugar, un estudio comparativo de la distribución genotípica de cada polimorfismo en función de la etiología de la cirrosis.

### *2.1 Polimorfismos de IL28B*

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen de la *IL28B* fueron distintas entre los sujetos trasplantados por VHC y los que se sometieron al trasplante hepático por cirrosis alcohólica, siendo el genotipo TT seis veces más frecuente en los pacientes con infección crónica por VHC en estadio terminal (cirrosis y HCC). Por otro lado, la distribución genotípica de este polimorfismo en los pacientes con cirrosis enólica fue similar a la publicada en estudios de población sana del sur de Europa<sup>136</sup>. Estos datos corroboran la asociación de los polimorfismos con la evolución de la enfermedad hepática por VHC, y ratifican que, en efecto, el IFN- $\lambda$  desempeña un papel central en la respuesta a las infecciones virales, particularmente la producida por VHC.

Los resultados de nuestro trabajo están en consonancia con estudios publicados por otros grupos. En un trabajo realizado en población italiana, Fabris y colaboradores<sup>136</sup> observaron una mayor proporción de genotipo desfavorable y de portadores del alelo T en los pacientes con cirrosis de etiología viral y los pacientes con cirrosis de otras etiologías, los cuales presentaban una distribución genotípica similar a los controles sanos. Asimismo, se observó mayor proporción de portadores de genotipo desfavorable y del alelo T en los pacientes con cirrosis asociada a VHC respecto a los individuos con cirrosis inducida por VHB. Entre los pacientes con infección crónica por VHC, los pacientes con cirrosis respecto a los pacientes con fibrosis leve o moderada, y los sujetos infectados con el genotipo 1 del VHC presentaron más frecuentemente el genotipo desfavorable de *IL28B*, hallazgos confirmados en nuestro trabajo.

## 2.2 Polimorfismos de TLRs

Se ha sugerido que los polimorfismos en los *TLRs* implicados en la respuesta inmune antiviral estarían implicados en la variabilidad individual de la historia natural de la hepatitis C<sup>137</sup>.

En el presente trabajo, el alelo A en el polimorfismo Glu11Leu de *TLR7* fue dos veces más frecuente en los varones con cirrosis VHC que en los varones con cirrosis alcohólica, sin observar diferencias respecto al genotipo viral en los pacientes con infección por VHC. El efecto de este polimorfismo sólo se encontró en varones. Es bien conocido que el sexo es uno de los factores clásicamente implicados en la progresión de la fibrosis en el seno de la infección VHC, presentando el sexo femenino un menor riesgo de progresión<sup>138</sup>. En nuestro trabajo, la diferencia entre varones y mujeres probablemente obedezca al escaso número de mujeres incluidas, particularmente entre los pacientes con cirrosis alcohólica. Sin embargo, puesto que el gen de *TLR7* se encuentra codificado en el cromosoma X, un rasgo con herencia recesiva sería más prominente en varones y menos en mujeres; al contrario, los rasgos dominantes codificados en el cromosoma X son más prevalentes en mujeres. Este hecho podría constituir una explicación alternativa a nuestros datos, comportándose como un rasgo con herencia recesiva.

*TLR7* se posiciona como un candidato prometedor a desarrollar un papel relevante en la evolución de la hepatitis C, puesto que reconoce ARN de cadena sencilla (el material genético presente en el VHC), y su estimulación induce la secreción de IFN-I. Sin embargo, no se han publicado muchos trabajos explorando la influencia de los polimorfismos de este gen en la evolución clínica de la enfermedad. Los principales se resumen en la tabla 32.

Schott y colaboradores<sup>139</sup> condujeron un estudio para evaluar la prevalencia de los polimorfismos de *TLR7* en pacientes caucásicos de origen predominantemente alemán infectados con VHC, y detectaron tres polimorfismos genéticos en *TLR7* con una frecuencia mayor del 5% que se encontraban sobrerrepresentados en los pacientes con hepatitis C crónica con fibrosis avanzada. Entre ellos se encontraba el polimorfismo Glu11Leu, que en nuestra población era más frecuente en los pacientes con cirrosis VHC que en los pacientes con cirrosis alcohólica. El mismo grupo, en un estudio posterior<sup>140</sup>, encontró una mayor prevalencia del polimorfismo Glu11Leu de *TLR7* en los pacientes con hepatitis crónica C que en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas de diferente etiología y que en controles sanos, resultados que se encuentran en consonancia con los nuestros.

Es importante destacar que, en nuestro estudio, cuando se realizó el estudio combinado de los genotipos desfavorables de *IL28B* y *TLR7*, la fuerza de la asociación con la cirrosis VHC aumenta respecto al estudio de ambos polimorfismos por separado, lo que refuerza



la asociación de estos polimorfismos con la mayor gravedad en la historia natural de la infección por VHC.

Tabla 32: Resumen de los trabajos que analizan la relación entre los polimorfismos de *TLR* y la evolución de la cirrosis por VHC.

Estudio	<i>TLR</i>	País, población	Resumen
Schott et al. <sup>139</sup> (2007)	<i>TLR7</i> Glu11Leu <i>TLR7</i> , c.1-120T>G	Alemania Hepatitis C crónica con diferentes grados de fibrosis	El polimorfismo Glu11Leu de <i>TLR7</i> fue más frecuente en los pacientes con cirrosis VHC que en los pacientes con fibrosis leve El polimorfismo, c.1-120T > G de <i>TR7</i> fue más frecuente en los pacientes con con fibrosis leve o ausente. Papel protector
Schott et al. <sup>140</sup> (2008)	<i>TLR7</i> Glu11Leu	Alemania Casos de hepatitis C crónica con diferentes grados de fibrosis Controles: hepatopatía de otra etiología y controles sanos	Mayor prevalencia del polimorfismo Glu11Leu de <i>TLR7</i> en pacientes con VHC que en otras etiologías y controles sanos
Eid et al. <sup>141</sup> (2007)	<i>TLR2</i> Arg753Gln	EEUU Recidiva de VHC postrasplante	El polimorfismo Arg753Gln de <i>TLR2</i> se asocia con mayor mortalidad por recidiva grave de VHC en pacientes con trasplante hepático
Citores et al. <sup>143</sup> (2016)	<i>TLR3</i> Leu41Phe. Varios polimorfismos de <i>TLR</i>	España Recidiva de VHC postrasplante	El genotipo CC en el polimorfismo Leu41Phe de <i>TLR3</i> se asocia a recidiva grave de la infección VHC en pacientes con trasplante hepático
Askar et al. <sup>144</sup> (2009)	Varios polimorfismos de <i>TLR3</i>	Alemania Infección crónica por VHC	No se encontró asociación
Guo et al. <sup>145</sup> (2009)	<i>TLR4</i> Thr399Ile <i>TLR4</i> c.896A>G	Estudios <i>in vitro</i> : células estrelladas humanas y de ratón	Ambos polimorfismos protegen de la fibrosis <i>in vitro</i>
Li et al. <sup>146</sup> (2009)	<i>TLR4</i> Thr399Ile <i>TLR4</i> c.1205G>T	Caucásicos americanos Casos: 263 hepatitis C con fibrosis avanzada (F3-F4) Controles: 157 hepatitis C sin fibrosis (F0)	El polimorfismo Thr399Ile de <i>TLR4</i> se asoció con mayor riesgo de fibrosis (p<0.001)

Otros autores han explorado la relación de varios polimorfismos en otros *TLR* y el curso de la hepatitis C (tabla 32), aunque la evidencia científica no es muy amplia en este campo. Los datos sobre la relación de los polimorfismos de *TLR2* en el contexto de la hepatitis C son escasos, y se limitan al escenario de la recidiva del VHC postrasplante, donde se ha relacionado el polimorfismo Arg753Gln de *TLR2* con la recidiva grave del VHC en el injerto<sup>141</sup>. En este trabajo no se realizaron análisis comparativos en función del genotipo presente en el polimorfismo de *TLR2* puesto que la frecuencia de variantes no comunes fue muy baja en nuestra población, tal y como se ha descrito previamente en población sana española<sup>142</sup>, lo que contrasta con lo publicado en la serie anterior<sup>141</sup> en la que se comunica una prevalencia de alrededor del 9 al 13% en caucásicos.

*TLR3*, que reconoce el ARN de doble cadena del VHC producido en los intermediarios replicativos del ciclo viral, podría estar relacionado con la evolución de la infección

crónica. Nuestro grupo ha publicado recientemente un trabajo en el que el genotipo CC en el polimorfismo Leu41Phe de *TLR3* se asoció con la recidiva grave de la infección VHC en pacientes con trasplante hepático<sup>143</sup>. Fuera del escenario del trasplante hepático, no se ha logrado relacionar los polimorfismos en *TLR3* con los datos clínicos o histológicos de la hepatitis C<sup>144</sup>.

En lo que respecta a los polimorfismos de *TLR4*, ha sido comunicada por varios autores su asociación con el desarrollo de fibrosis avanzada y cirrosis<sup>145-146</sup>. Se han descrito varios polimorfismos, la mayoría en alto desequilibrio de ligamiento y heredados habitualmente juntos, que se asocian en distinto grado con fibrosis hepática en pacientes caucásicos infectados por VHC. En nuestro trabajo, el polimorfismo Asp299Gly de *TLR4* no se encontró sobrerrepresentado en los pacientes con cirrosis VHC respecto a los pacientes con cirrosis enólica, lo cual podría explicarse por ausencia de efecto de este polimorfismo en nuestra cohorte, o bien porque el efecto de dicho polimorfismo en la progresión de la fibrosis fuera independiente de la enfermedad hepática que la produce. Lamentablemente, el diseño de este trabajo no permite aclarar este punto. La fibrosis hepática ocurre en respuesta al daño hepático de cualquier origen, siendo el sistema inmune innato un elemento crucial en su patogenia. En particular, en la enfermedad alcohólica del hígado, puesto que se ve aumentada la traslocación bacteriana, y en consecuencia los niveles de LPS, ligando de *TLR4*, en la circulación portal, los polimorfismos desfavorables de *TLR4* podrían estar sobrerrepresentados también en los pacientes con cirrosis alcohólica. Existen algunas evidencias experimentales que apoyan esta teoría<sup>147</sup>.

---

### 3 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DE LOS HCC

---

El trasplante hepático se considera el tratamiento de elección para los pacientes con HCC que presentan una situación funcional hepática que no permite la resección (Child-Pugh B o C), cuyos tumores cumplen los criterios de Milan (tumores únicos menores de 5 cm o presencia de 2 o 3 nódulos de menos de 3 cm), según el sistema de clasificación BCLC<sup>35</sup>. Este es el sistema de estadiaje recomendado por las guías europeas y americanas<sup>36,37</sup>, y el utilizado, como en la gran mayoría de los centros de trasplante nacionales, en el HUPHM. La evaluación de la extensión del tumor tiene una importancia crucial para definir el estadio y la estrategia de tratamiento. Sin embargo, varios estudios que correlacionan el estadiaje tumoral pretrasplante por las técnicas de imagen aplicadas de rutina con los hallazgos anatomopatológicos tras el análisis del explante ponen de manifiesto que las técnicas de imagen infravaloran la extensión tumoral hasta en un 20-30% de los casos<sup>148-149</sup>, un porcentaje algo inferior al observado en nuestra serie (41,8% en HCC asociado a VHC y 44,4% en HCC asociado a cirrosis alcohólica).

El mayor porcentaje de tumores que exceden los criterios de Milan observado en este estudio podría explicarse, al menos en parte, por la inclusión de pacientes desde el año 1997, fecha de implementación de los criterios de Milan para la selección de pacientes. Las técnicas de imagen empleadas en la valoración rutinaria de los HCC se han ido perfeccionando a lo largo del tiempo, y su precisión ha mejorado sustancialmente en los últimos años. Por tanto, es de esperar que los pacientes que se estadiaron antes de la generalización del uso de la resonancia magnética o la ecografía con contraste presenten mayor discordancia con el análisis anatomopatológico del explante.

Por otra parte, en los últimos años se ha incrementado el tiempo de permanencia en lista de espera de trasplante, debido a la escasez de órganos, lo que podría redundar en progresión de la enfermedad desde que se realiza la valoración por pruebas de imagen hasta que se realiza el trasplante.

Por último, es necesario resaltar que, de acuerdo con las guías de práctica clínica disponibles, los pacientes que recibieron trasplante hepático en nuestro centro y cuya estancia en lista de espera se preveía mayor a 6 meses, recibieron tratamiento neoadyuvante con terapias locorregionales, lo que podría constituir un factor de confusión a la hora de interpretar los resultados del análisis histológico del explante. En todo caso, se observaría una infraestimación del estadio tumoral como consecuencia del tratamiento pretrasplante, por lo que no podemos descartar que el porcentaje de tumores que exceden los criterios de Milan pudiera haber sido aún mayor en los pacientes sometidos a trasplante hepático en los últimos años. Por otro lado, los pacientes con HCC que permanecen en lista de espera actualizan su estadio tumoral con

la periodicidad ordinaria en la práctica clínica, por lo que no es posible asegurar que, de haber repetido las pruebas de imagen en el momento del trasplante, los pacientes hubieran dejado de ser candidatos al mismo.

Al analizar las causas por las que los tumores excedían los criterios de Milán para el trasplante, llama la atención la proporción de casos que lo hacían por multicentricidad. Mientras que la mayoría de los tumores únicos cumplían el criterio de tamaño menor de 5 cm (91,7% en los HCC asociados a VHC y 80% de los HCC sobre cirrosis alcohólica), en los casos en los que se diagnosticaron por técnicas de imagen 2 o 3 nódulos de hepatocarcinoma, sólo un 26% de los pacientes con HCC asociado a VHC y un 36% de los pacientes con HCC asociado a alcohol seguían cumpliendo los criterios de Milan tras el análisis histológico. Especialmente interesante resulta que, entre los pacientes con 2-3 nódulos menores de 3 cm, en torno al 40% presentaron multicentricidad en el estudio del explante, conocido factor de riesgo de invasión vascular. Estos datos ponen de manifiesto la dificultad de las pruebas de imagen habituales para detectar nódulos tumorales de pequeño tamaño, particularmente en la evaluación de hígados cirróticos que presentan nódulos de regeneración como parte de la enfermedad de base.

El principal inconveniente del trasplante hepático como tratamiento para el HCC es la escasez de donantes, que condiciona largos tiempo en lista de espera, de modo que hasta un 20% de los candidatos a trasplante salen de lista por progresión de la enfermedad antes de que se disponga de un órgano para efectuar el trasplante. En este sentido, se han propuesto varias estrategias para optimizar los resultados en este grupo de pacientes, a saber: la revisión de las políticas de prioridad y asignación de órganos, el empleo de tratamientos durante la estancia en lista de espera, el trasplante hepático de donante vivo, la reducción del estadio tumoral con tratamiento neoadyuvante para una posterior inclusión en lista de trasplante y la ampliación de los criterios de selección actuales.

Respecto a esta última estrategia, se han realizado varias propuestas para ampliar los criterios de Milan (tabla 33), como los criterios expandidos de la Universidad de California, San Francisco (UCSF, *University of California, San Francisco*)<sup>150</sup>, definidos como un tumor único <6,5cm o hasta 3 tumores, siempre que la suma de todos sus diámetros sea menor de 8cm, o el sistema “Up-to-seven” (“hasta siete”), por el que serían candidatos a trasplante hepático aquellos pacientes cuyos tumores no excedan el valor de 7 al sumar el tamaño del tumor más grande con el número de tumores<sup>151</sup>. Esta propuesta se basa en el análisis retrospectivo de datos anatomopatológicos, y ha sido validada en una serie independiente<sup>152</sup>. No obstante, los resultados de supervivencia libre de enfermedad a 5 años varían ampliamente, entre el 70% y el 40%, según la presencia de invasión microvascular. El sistema “hasta siete” sólo sería aplicable, pues, a pacientes sin invasión vascular. Así, serían necesarios marcadores preoperatorios de la invasión vascular, puesto que las técnicas de imagen actuales no

permiten un diagnóstico suficientemente preciso, como apoyan nuestros resultados: en el 9% de los pacientes con HCC asociado a VHC y en el 21% de los pacientes con HCC sobre cirrosis enólica se demostró invasión vascular en el explante.

**Tabla 33:** comparativa de los distintos criterios propuestos para la selección de pacientes con HCC para trasplante hepático

<b>CRITERIOS DE MILAN<sup>38</sup></b>	<b>CRITERIOS UCSF<sup>150</sup></b>	<b>SISTEMA “UP-TO-SEVEN”<sup>151</sup></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tumor único ≤5cm</li> <li>▪ Hasta 3 tumores ≤3 cm</li> <li>▪ Sin invasión vascular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tumor único ≤6,5cm</li> <li>▪ Hasta 3 tumores, suma de diámetros ≤8cm</li> <li>▪ Sin invasión vascular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Suma del diámetro del tumor de mayor tamaño más el número de tumores ≤ 7</li> <li>▪ Independientemente del número de tumores</li> <li>▪ Sin invasión vascular</li> </ul>

En la última edición de las guías europeas<sup>36</sup> no se recomienda, por el momento, la expansión de los criterios de Milan, a la espera de resultados de supervivencia a 5 años. De igual forma, no se recomiendan las políticas de reducción del estadio para los HCC que superan los criterios convencionales mientras no se disponga de evidencia robusta sobre sus resultados.

En nuestra serie, los pacientes que excedieron los criterios de Milan presentaron más frecuentemente recidiva del HCC durante el seguimiento postrasplante, y una tendencia a menor supervivencia a 5 años. Al analizar los motivos por los que se excedían los criterios de Milan y relacionarlos con la supervivencia, se observó que los pacientes que excedieron los criterios de Milan por tamaño presentaban una supervivencia prácticamente superponible a los pacientes cuyos tumores cumplían los criterios de Milan; por el contrario, en el caso de los tumores que excedían los criterios de Milan por multicentricidad, la supervivencia se veía drásticamente disminuida, particularmente en los 5 primeros años.

Estos datos son concordantes con algunos estudios que sugieren que el tamaño del tumor no impacta en la supervivencia tras aplicar tratamientos curativos (resección o trasplante hepático), siempre que no exista invasión vascular (tumores pT1 en la clasificación TNM de la AJCC)<sup>153-154</sup>, y que apoyan la expansión de los criterios de Milan. El hecho de que un tumor solitario grande continúe siendo único y no muestre invasión macrovascular reflejaría una conducta biológica más benigna.

Hubiera sido de gran interés evaluar la recidiva del tumor y el impacto en la supervivencia en base al uso de los criterios UCSF y “up-to-seven”. Lamentablemente, no fue posible el análisis de la correlación de los datos histológicos de nuestro estudio según otros sistemas de estadiaje propuestos, puesto que en gran parte de los informes procedentes de anatomía patológica los HCC con más de 5 nódulos se describían como

muticéntricos, sin especificar el número de nódulos. Por otra parte, en los tumores con varios nódulos, no siempre se especificaba el tamaño de cada uno de ellos.

Respecto a la invasión vascular, que fue especialmente frecuente en los pacientes con HCC asociado a cirrosis enólica, nuestros resultados son acordes a los previamente comunicados en la literatura<sup>155-156</sup>. Se confirma que su presencia es uno de los principales predictores de recidiva de la enfermedad postrasplante, ya que más del 50% de los pacientes con invasión vascular presentaron recidiva del HCC durante la evolución. No se pudo llevar a cabo el estudio del impacto de la presencia de invasión vascular en la supervivencia postrasplante por número insuficiente de casos para el análisis.

---

## 4 FACTORES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO Y EL PRONÓSTICO DEL HCC

---

El HCC es, como se ha revisado ampliamente en la introducción a este trabajo, un problema de salud de primer orden cuya incidencia, al contrario que en otros tipos de cáncer, está en aumento en los últimos años<sup>157</sup>. De hecho, la epidemiología del HCC está experimentando un profundo cambio producido por el dramático descenso de los casos vinculados al VHB en Asia, gracias a las campañas de vacunación universal, mientras aumentan los casos asociados a la enfermedad crónica relacionada con VHC y alcohol. Por otro lado, la epidemia actual de obesidad en el mundo occidental condicionará en un futuro próximo un incremento exponencial de los casos de esteatohepatitis no alcohólica, y consecuentemente de los casos de HCC.

En los últimos años se ha producido una mejoría sustancial en el manejo del HCC, de modo que entre el 50 y el 70% de los pacientes diagnosticados de HCC temprano presentan una supervivencia mayor de 5 años tras el tratamiento curativo apropiado según el algoritmo propuesto por la clasificación de Barcelona (BCLC)<sup>35</sup>. En este contexto, las estrategias de diagnóstico precoz son una herramienta esencial, puesto que han demostrado ser capaces de detectar HCC en estadio temprano, de manera que se expande la aplicabilidad de los tratamientos curativos para así disminuir la mortalidad específica de la enfermedad<sup>158-160</sup>.

El único método que ha demostrado eficacia en el diagnóstico precoz del HCC, es la inclusión de los sujetos de riesgo, esto es, los pacientes con cirrosis hepática de cualquier origen, en programas de cribado<sup>36-37</sup>. Es necesario recordar que el tratamiento satisfactorio de los pacientes con infección crónica por VHC que han desarrollado cirrosis hepática disminuye, pero no elimina, el riesgo de desarrollar HCC, y estos pacientes deben mantener el cribado<sup>26</sup>. Por ello, pese a que en los próximos años es probable que con la generalización del uso de los antivirales directos se consiga erradicar, en los países desarrollados, la infección por VHC, los modelos pronósticos predicen un aumento de los casos de HCC en la próxima década, a expensas de los pacientes que reciben tratamiento ya en estadio de cirrosis<sup>50</sup>.

Los programas de cribado se basan en la realización de ecografías semestrales. La ecografía posee una sensibilidad del 94% para la detección de HCC, aunque disminuye a sólo el 63% para el diagnóstico de lesiones precoces. Sin embargo, es habitual encontrar discrepancias entre los hallazgos obtenidos por imagen y los resultados encontrados tras el análisis histopatológico en aquellos pacientes sometidos a resección hepática o trasplante, hallazgo que se confirma en este trabajo. Mención especial merece la

detección de invasión microvascular y de micronódulos satélites, puesto que su diagnóstico por imagen es particularmente difícil. Los datos procedentes de la revisión de la práctica clínica ponen de manifiesto que más del 60% de los pacientes se diagnostican en estadios tardíos en los que no es posible ofrecer tratamientos curativos.

La detección precoz de las enfermedades por medio de un screening o cribado diagnóstico persigue la identificación de una enfermedad durante el periodo asintomático o subclínico. Se trata, por tanto, de una actividad de prevención secundaria, es decir, que su objetivo es reducir la morbilidad o mortalidad prematura asociadas a la enfermedad, y no prevenir su aparición. Uno de los requisitos fundamentales para justificar la implementación de estrategias de cribado es que la identificación de la enfermedad en fase temprana muestre claros beneficios en su manejo terapéutico.

La mayoría de los HCC muestran una carcinogénesis secuencial en varias etapas desde nódulo displásico a HCC temprano y posteriormente HCC invasor. Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado una evidencia robusta que confirma que la historia natural del HCC es muy heterogénea<sup>161-162</sup>. En algunos casos el HCC debuta como múltiples nódulos con tasas variables de crecimiento, que pueden constituir metástasis del HCC inicial o bien varios tumores distintos que se desarrollan de forma sincrónica. Un problema clínico de singular relevancia es el diagnóstico precoz de HCC de rápida progresión, en los que su detección podría no acompañarse de una mejoría del pronóstico. El tamaño del tumor en el momento del diagnóstico no predice la evolución de la enfermedad con exactitud, dado que se ha descrito que la mediana del tiempo en el que un HCC duplica su masa puede variar entre uno y veinte meses<sup>163</sup>. La variabilidad en el curso de HCC es especialmente problemático cuando el tratamiento elegido es el trasplante hepático. La incorporación al sistema MELD de la probabilidad de salir de la lista de espera por progresión del HCC o por muerte secundaria al HCC se realiza asumiendo un crecimiento tumoral constante.

Así las cosas, los esfuerzos se han centrado en confeccionar una clasificación biológica de los HCC que diferencie los HCC agresivos y menos agresivos para así elegir la estrategia de tratamiento adecuada. No existe en la actualidad ninguna prueba clínica rutinaria que permita predecir el comportamiento biológico del tumor. Los biomarcadores podrían ser una herramienta útil en este sentido; sin embargo, la clasificación molecular del HCC basada en firmas génicas o en anomalías moleculares no está preparada aún para la aplicación clínica.

Por todo lo anterior, es necesario el estudio de los factores que influyen en el desarrollo y la progresión del HCC, así como su habilidad para el desarrollo de invasión vascular, para predecir el comportamiento del HCC, y así seleccionar aquellos pacientes que



podrían beneficiarse de un manejo más agresivo desde etapas iniciales, o que, por contra, podrían tratarse con una estrategia conservadora.

#### *4.1 Factores relacionados con el desarrollo de HCC*

En cuanto a los factores relacionados con el desarrollo de HCC, nuestro trabajo confirma lo comunicado en otras series respecto a la edad y el sexo. Los pacientes con HCC presentaron mayor edad al trasplante que los pacientes con cirrosis en las dos etiologías estudiadas, como es habitual en las series occidentales<sup>130, 155</sup> y fueron con mayor frecuencia varones, acorde con el intenso predominio mostrado por el HCC en el sexo masculino, constante en todos los registros a nivel mundial<sup>1</sup>.

En nuestra población, la indicación del trasplante fue el HCC con más frecuencia en los pacientes con cirrosis por VHC que en los pacientes con cirrosis enólica, similar a lo observado en la mayoría de las series. En los pacientes con infección por VHC, no se observó influencia del genotipo viral en el desarrollo de HCC, como se ha comunicado ampliamente en la literatura<sup>164</sup>.

En la introducción a este trabajo, se ha revisado una serie de observaciones que apoyan la influencia de factores genéticos en el desarrollo de HCC, cuya asociación constituye uno de los principales objetivos de este estudio.

##### *4.1.1 Polimorfismos de IL28B*

En primer lugar, propusimos el polimorfismo rs12979860 C/T, cerca del promotor del gen de la *IL28B*, en base a la fuerte evidencia de su relación con el aclaramiento espontáneo y con la respuesta a tratamientos basados en interferón en los pacientes infectados por VHC<sup>79-83</sup>. Además de sus propiedades antivirales, algunos estudios recientes sugieren que el IFN-λ, producto del gen de la *IL28B*, estaría implicado en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y el control de células mutadas. Varios trabajos han demostrado de forma contundente la asociación del genotipo desfavorable de la *IL28B* con la progresión de la fibrosis y el desarrollo de cirrosis<sup>84-87</sup>; sin embargo, la evidencia de la asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de HCC es escasa y contradictoria.

La determinación del polimorfismo de la *IL28B* está ampliamente disponible en la práctica clínica habitual, puesto que constituía uno de los elementos de decisión para tratar a los pacientes infectados por VHC en la etapa del interferón. Por lo tanto, si el genotipo desfavorable en este polimorfismo implicara un mayor riesgo de desarrollar

HCC, sería una herramienta clínica de gran utilidad que permitiría adaptar el programa de cribado al riesgo individual de los pacientes.

Para explorar la influencia del polimorfismo de la *IL28B* en el desarrollo de HCC de forma específica, eliminando la influencia sobre la evolución de la enfermedad hepática asociada a VHC, se comparó la distribución genotípica del polimorfismo de la *IL28B* entre los pacientes infectados por VHC con y sin HCC, pero no se encontraron diferencias. Como se ha comentado anteriormente, sí se observó una sobrerrepresentación del alelo variante T (genotipos CT y TT) en los pacientes con cirrosis VHC respecto a los pacientes con cirrosis alcohólica, sin observar diferencias en función de la presencia de HCC (figura 23). De esta manera, podemos concluir que el genotipo desfavorable en el polimorfismo de la *IL28B* se relaciona con la evolución de la enfermedad hepática relacionada con VHC, pero no influye en el desarrollo de HCC.

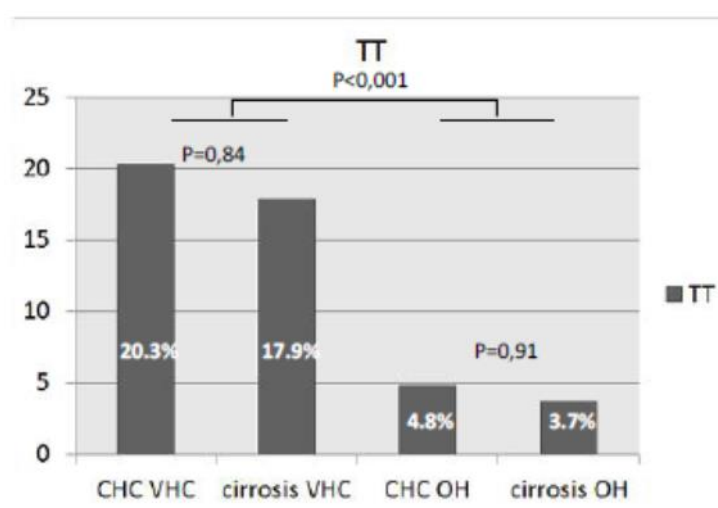


Figura 23: Frecuencia del genotipo TT en el polimorfismo de *IL28B* en las distintas poblaciones del estudio.

Hasta la fecha, se ha publicado un buen número de trabajos que evalúan, como objetivo principal o como parte de los objetivos secundarios, la relación entre los polimorfismos en el gen de la *IL28B* y el HCC. Los más representativos se resumen en la tabla 34.

**Tabla 34:** Resumen de los trabajos que analizan la relación entre los polimorfismos de *IL28B* y el desarrollo de HCC.

Estudio	<i>IL28B</i> y HCC	Etiología	País, población	Resumen
Fabris et al. 2011 <sup>136</sup>	No se compara con pacientes cirróticos	VHB, VHC, alcohol Subestudio VHC	Italia. -704 hepatopatías crónicas (434 VHC, 132 VHB, 110 alcohol) en distintos estadios evolutivos (256 trasplantados, 156 cirrosis, 292 fibrosis leve-moderada) -85 HCC, 35 HCC-VHC -344 controles sanos.	<i>IL28B</i> TT sobrerrepresentado en cirrosis viral ( $p<0.001$ ) <i>IL28B</i> TT más frecuente en cirrosis VHC que en hepatitis crónica con fibrosis moderada <i>IL28B</i> TT sobrerrepresentado en HCC-VHC respecto a los HCC de otras etiologías
Agundez et al. 2012 <sup>165</sup>	No	VHC	España. -268 hepatitis C crónica -134 HCC-VHC	Distribución genotípica similar entre hepatitis C y HCC Mayor actividad necroinflamatoria en <i>IL28B</i> TT
Akkiz et al. (2014) <sup>166</sup>	No	VHC	Turquía. -187 HCC de diferentes etiologías	No relación entre los polimorfismos de <i>IL28B</i> ni en la cohorte completa ni en los HCC-VHC/VHB
Joshita et al. 2012 <sup>167</sup>	No	VHC	Japón. -511 VHC crónica, 69 HCC	No diferencias en la distribución genotípica de los polimorfismos de <i>IL28B</i> entre los pacientes con hepatitis C crónica y los pacientes con HCC
Eurich et al. 2012 <sup>168</sup>	Sí	VHC	Alemania. -167 VHC con trasplante hepático, 61 HCC	Mayor prevalencia de HCC en los explantes de pacientes con genotipo TT de <i>IL28B</i>
Ren et al. (2012) <sup>169</sup>	Si (VHB) *comparan HCC con hepatitis B crónica, no con cirrosis VHB	VHB	China. -154 HCC-VHB -86 hepatitis B crónicas -43 hepatitis B autolimitadas -47 controles sanos	El alelo T en el polimorfismo de la <i>IL28B</i> incrementa el riesgo de desarrollar infección crónica por VHB y HCC
Lee et al. (2013) <sup>170</sup>	No	VHB	China. -404 hepatitis B autolimitadas -123 hepatitis B crónicas -305 cirrosis VHB - 417 HCC- VHB	No asociación entre el polimorfismo de la <i>IL28B</i> y la evolución natural de la infección por VHB ni el desarrollo de HCC
Chen et al. (2012) <sup>171</sup>	Si	VHB	China. -406 cirrosis VHB -406 HCC-VHB -393 hepatitis crónica B -244 controles sanos	<i>IL28B</i> TT y CT más frecuente en los pacientes con cirrosis y HCC asociados a VHB que en controles sanos Alelo T en <i>IL28B</i> más frecuente en HCC-VHB que en cirrosis VHB

En consonancia con nuestros resultados, varios estudios en población europea<sup>165,166</sup> y asiática<sup>167</sup> han explorado la relación entre los polimorfismos de *IL28B* y el desarrollo de HCC en pacientes con infección por VHC, sin encontrar tal asociación. En otro estudio, Fabris y colaboradores<sup>136</sup>, analizaron la distribución genotípica del polimorfismo de la *IL28B* en una población amplia de pacientes con hepatopatía crónica de distintas etiologías y en diferentes estadios. Estos autores encontraron una sobrerrepresentación del genotipo TT en los pacientes con HCC asociado a VHC, concluyendo que ser portador del alelo T es un predictor independiente de la aparición de HCC. Sin embargo, en este trabajo no se analiza la diferencia en la distribución genotípica del polimorfismo de *IL28B* entre los pacientes con cirrosis VHC con y sin HCC; la sobrerrepresentación del alelo T en los pacientes sometidos a trasplante hepático por HCC podría estar justificado por la mayor presencia de pacientes con HCC asociado a VHC, siendo la cirrosis por VHC la responsable de la agregación de los genotipos desfavorables en este grupo de pacientes, y no necesariamente la presencia de HCC.

El único estudio en el que sí se ha demostrado relación entre el polimorfismo de *IL28B* y el desarrollo de HCC fue el conducido por Eurich y colaboradores<sup>168</sup>, en el que se analiza el polimorfismo rs12979860 de la *IL28B* en 167 pacientes caucásicos con trasplante hepático por cirrosis VHC, 61 (36,5%) de los cuales presentaban HCC; en este estudio, la prevalencia de HCC fue significativamente mayor entre los pacientes con genotipo TT ( $p=0,041$ ), por lo que los autores concluyen que el alelo T podría ser considerado un factor genético de riesgo para la carcinogénesis.

Se han publicado diversos trabajos que exploran la relación del polimorfismo de la *IL28B* con el desarrollo de HCC en pacientes con infección crónica por VHB<sup>169-171</sup>. De nuevo los resultados obtenidos son contradictorios (tabla 34).

Debido a la controversia generada por los resultados discordantes de los distintos estudios realizados, se han realizado dos revisiones sistemáticas<sup>172,173</sup>, resumidas en la tabla 35, con la intención de dilucidar si el polimorfismo de la *IL28B* presenta asociación con el desarrollo de HCC aumentando el tamaño muestral y homogeneizando los subgrupos. En ambos metaanálisis se concluye que existe una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo rs12979860 del gen de la *IL28B* y el desarrollo de HCC, que resulta particularmente evidente si sólo se analizan los datos de los pacientes con infección crónica por VHC. Sin embargo, en ambos metaanálisis la mayoría de los controles eran sujetos sanos y pacientes con hepatitis con grados leves de fibrosis. No se estudia de forma específica el incremento del riesgo que otorga el genotipo desfavorable utilizando como controles pacientes con cirrosis viral sin HCC.

**Tabla 35:** Resumen de los metaanálisis que analizan la relación entre los polimorfismos de *IL28B* y el desarrollo de HCC.

REVISIÓN SISTEMÁTICA	SUO <sup>172</sup> (2013)		HE <sup>173</sup> (2014)	
ESTUDIOS INCLUIDOS	VHC: 3 estudios cirrosis VHC 4 estudios HCC VHC		4 estudios HCC VHC	
	VHB: 1 estudio cirrosis VHB 1 estudio HCC VHB		2 estudios HCC VHB	
RAZA	6 estudios: caucásica 1 estudio: asiática		4 estudios: caucásica 2 estudio: asiática	
POBLACIÓN	Población de estudio 1152 casos: cirrosis y HCC (VHC y VHB)	Población control 1326 controles: Hepatitis crónica B o C con fibrosis leve; controles sanos	Población de estudio 850 casos de HCC	Población control 811 controles 1 estudio: cirrosis sin HCC <sup>a</sup> 2 estudios: hepatitis crónica C con fibrosis leve 3 estudios: controles sanos
CONCLUSIÓN	El genotipo TT en el polimorfismo de <i>IL28B</i> es un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis y HCC de etiología viral (OR=1,59), particularmente en pacientes VHC (OR=1.73)		El genotipo TT en el polimorfismo de <i>IL28B</i> es un factor de riesgo para el desarrollo de HCC (OR=1,79), comparado con hepatitis crónica con fibrosis leve y controles sanos	

<sup>a</sup>Único estudio que compara la distribución genotípica del polimorfismo de *IL28B* de los casos de HCC con los de cirrosis

Por tanto, de forma general, los resultados de este trabajo son acordes con los datos publicados previamente en la literatura, y sugieren que la sobrerrepresentación de los polimorfismos desfavorables de la *IL28B* se observa principalmente en los pacientes con infección crónica por VHC en estadio terminal (HCC y cirrosis), apoyando la implicación del IFN $\lambda$  en la respuesta inmune antiviral, y en concreto, en la respuesta contra el VHC. Sin embargo, su papel en el desarrollo de HCC en pacientes con cirrosis VHC no queda demostrado con las evidencias de este trabajo. En la mayoría de los trabajos en los que se apunta una relación entre el genotipo desfavorable de *IL28B* y el desarrollo de HCC, esta podría explicarse por la contribución del polimorfismo a una peor evolución de la enfermedad hepática, comportándose en realidad como un factor de riesgo de desarrollo de cirrosis.

#### 4.1.2 Polimorfismos de *TLRs*

Los TLRs, como se ha revisado en la introducción a este trabajo, son los principales receptores que utiliza el sistema inmune innato para el primer reconocimiento de la infección viral en el contexto de la infección por VHC, y juegan un papel central en la orquestación de la respuesta inmune antiviral. Además de su presumible papel en la evolución de la hepatitis C, se ha sugerido un papel notable de los TLRs en el desarrollo y progresión de los tumores humanos. Varios estudios *in vitro* demuestran la implicación de los TLRs en el proceso de oncogénesis en distintas líneas celulares<sup>118-121</sup>. Los que más frecuentemente se han relacionado con la iniciación y el mantenimiento del proceso oncogénico son TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9. El conocimiento de la implicación de los TLRs y sus vías de señalización en el desarrollo y progresión de las enfermedades oncológicas abre un extenso campo de estudio de fármacos cuya diana sería la modulación de la expresión y función de los TLRs<sup>174-175</sup>. Varios autores han estudiado el papel de los frecuentes polimorfismos genéticos en los genes que codifican dichos receptores en la diferente susceptibilidad de los individuos a desarrollar cáncer<sup>176</sup>.

El HCC se desarrolla sobre hígados cirróticos en la gran mayoría de las ocasiones, como resultado de la inflamación hepática crónica y de los procesos regenerativos. Es bien conocida la relación entre la inflamación crónica y el cáncer, siendo el HCC el prototipo perfecto de esta teoría inflamatoria del cáncer: la inflamación crónica hepática es el evento clave que subyace al desarrollo del HCC. Los TLRs se expresan de forma ubicua en células inflamatorias, y algunos de ellos lo hacen también en hepatocitos y células estrelladas, desempeñando un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune innata, crucial en el reconocimiento de células infectadas por virus y células transformadas. Por otra parte, el incremento de los productos bacterianos circulantes, hecho constante en la cirrosis avanzada, supone un gran aumento de ligandos para los TLRs, favoreciendo la activación inmune que perpetúa el proceso inflamatorio.

Algunos estudios han demostrado un incremento en la expresión de TLR7 y TLR9 en líneas celulares de HCC humano<sup>177-178</sup> respecto a la expresión constitutiva en células sanas, y, de forma muy interesante, en niveles muy superiores a los encontrados en muestras procedentes de hepatitis y cirrosis. Sin embargo, no existen trabajos que estudien la asociación del desarrollo de HCC y los polimorfismos de *TLRs*.

En base a las evidencias arriba expuestas, analizamos si los polimorfismos de varios *TLRs* podrían estar relacionados con el desarrollo de HCC, independientemente de su influencia sobre la evolución de la enfermedad crónica por VHC. Elegimos los SNP más habituales de los genes que codifican para los TLRs implicados en la respuesta antiviral y en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis y la inmunovigilancia antitumoral tras un exhaustivo análisis de la literatura. Ninguno de los polimorfismos analizados se asoció con el desarrollo de HCC cuando se empleaban como controles los pacientes cirróticos sin HCC.

## 4.2 Factores relacionados con el pronóstico del HCC

El HCC muestra un comportamiento biológico heterogéneo, que conduce a distintas tasas de supervivencia de los pacientes con HCC que no reciben tratamiento<sup>179</sup>, sin que se hayan identificado los factores que influyen en el mismo. Conocerlos sería de gran utilidad en la práctica clínica, puesto que permitiría ofrecer estrategias terapéuticas personalizadas. De hecho, en la última edición de las guías de práctica clínica se recomienda encarecidamente el estudio de los distintos marcadores genéticos, tisulares y séricos con el objeto de incorporarlos al algoritmo actual de manejo del HCC y avanzar así hacia una medicina personalizada<sup>36</sup>. Sin embargo, hasta el momento ninguno de los marcadores estudiados ha demostrado con la evidencia suficiente ser una herramienta útil en la evaluación pronóstica del HCC.

Algunos autores han propuesto firmas génicas utilizando marcadores tisulares con el objetivo de predecir la agresividad de la enfermedad. Así, se ha sugerido que diferentes marcadores inmunohistoquímicos podrían ser de utilidad en la evaluación de la neovascularización y la capacidad metastásica de los tumores<sup>180</sup>, o relacionarse con peor evolución<sup>181</sup>. Distintos grupos han propuesto clasificaciones moleculares y firmas génicas que identifican HCC de peor pronóstico<sup>182-188</sup>, pero ninguna de las cuales ha podido integrarse, por el momento, en los algoritmos actuales de manejo del HCC.

Sin embargo, puesto que el diagnóstico de HCC a menudo se realiza por técnicas de imagen, no es habitual disponer de biopsias en las que analizar estos marcadores tisulares. Por tanto, sería de mayor interés en la práctica clínica el estudio de marcadores serológicos útiles para el pronóstico de la enfermedad. En este sentido, se ha demostrado que los niveles de alfafetoproteína, el factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) y angiopoetina-2 (Ang2) podrían ser marcadores independientes de mal pronóstico en grandes cohortes de HCC avanzado sin tratamiento activo<sup>189</sup>, aunque su contribución en la toma de decisiones en el algoritmo de manejo de los pacientes con HCC no se ha demostrado de utilidad hasta el momento.

Los polimorfismos genéticos son marcadores especialmente atractivos para su empleo en el manejo del HCC por tratarse de pruebas genéticas, que se realizan sólo una vez en la vida del individuo, y en cualquier momento de la enfermedad.

Para evaluar el pronóstico del HCC postraplante, se han seleccionado, por una parte, los factores asociados con la recidiva de la enfermedad, principal causa de muerte tras tratamiento en la patología oncológica, y los factores asociados a una menor supervivencia, por otra.

#### 4.2.1 Recidiva del HCC postrasplante

En nuestra serie, se registró una tasa global de recidiva de HCC postrasplante del 12,36%, similar a la comunicada por otros grupos, que se sitúa entre el 8 y el 15%<sup>130,190</sup>. Se incluyó en este análisis al 80% de los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC. El resto se excluyó por presentar un periodo de seguimiento menor de 6 meses tras el trasplante (18 pacientes), puesto que se consideró que este tiempo no fue suficiente para evidenciar la recidiva de la enfermedad; un paciente fue excluido por enfermedad diseminada en el momento del trasplante. La mayor parte de los pacientes excluidos fallecieron o recibieron un retrasplante en el primer mes postrasplante por complicaciones relacionadas con la cirugía o infecciones nosocomiales.

Según los datos del RETH<sup>130</sup>, hasta el 40% de las recidivas de HCC tras el trasplante hepático se producen en los dos primeros años de seguimiento. En este estudio, ésta se diagnosticó a los 34 meses de mediana, si no se consideran los dos pacientes con una recidiva después de los 100 meses postrasplante.

La recidiva fue más frecuente en los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC asociado a cirrosis alcohólica que en los pacientes con HCC asociado a VHC, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. Esta mayor tasa de recidiva podría estar en relación con la mayor frecuencia de invasión vascular demostrada en los explantes de los pacientes con HCC sobre cirrosis alcohólica. No hubo diferencias en función de la edad ni el sexo.

En la práctica clínica habitual, se emplean los criterios de Milan para seleccionar a los pacientes con HCC que se beneficiarán del trasplante hepático como tratamiento, puesto que este sistema ha demostrado ampliamente que los resultados de trasplante en los pacientes que cumplen dichos criterios son similares a los obtenidos en pacientes que reciben trasplante hepático por otras indicaciones, minimizando el riesgo de recurrencia. Sin embargo, en los últimos años, se ha criticado la ausencia de precisión de esta herramienta para predecir el comportamiento biológico del tumor. Varios grupos han investigado marcadores que permitan identificar los tumores más agresivos, y aquellos con más riesgo de recidiva postrasplante. En este sentido, ha sido recientemente publicado un trabajo en que se propone una herramienta para predecir el riesgo de recidiva que incluye criterios bioquímicos (determinación de alfafetoproteína e índice neutrófilo-linfocito) y radiológicos (diámetro de la lesión mayor por encima de 3 cm) pretrasplante, así como criterios anatomopatológicos (presencia de invasión vascular en el explante, diámetro de la lesión mayor por encima de 3cm, presencia de más de 3 nódulos y tumores de alto grado histológico)<sup>191</sup>. Esta nueva escala de clasificación del riesgo de recidiva, si se validara por grupos independientes, podría ser una herramienta de gran utilidad en la práctica clínica. Los resultados de nuestro trabajo apoyan la utilidad de los ítems de esta nueva escala que han sido analizados en



nuestra serie, esto es, tamaño tumoral, tanto en la valoración pretrasplante, como en el análisis patológico del explante, y presencia de más de tres nódulos en el estudio de la pieza de hepatectomía.

Así, los factores independientemente asociados a la recidiva postrasplante en el análisis multivariante realizado en nuestra serie, y que, por tanto, podrían ser considerados como marcadores de peor evolución postrasplante fueron: exceder los criterios de Milan, la presencia de invasión vascular y el genotipo CT en el polimorfismo -1486 del *TLR9*. Tanto la invasión vascular como superar los criterios de Milan, son conocidos factores de riesgo de recidiva de la enfermedad tras el trasplante<sup>190</sup>. En nuestra serie, la mayoría de los pacientes en los que se demostró invasión vascular en el explante presentaban HCC multicéntricos. Respecto al polimorfismo genético de *TLR9*, este es el primer trabajo que relaciona dicho SNP con mayor riesgo de recidiva.

#### a. Adecuación a los criterios de Milan

En este trabajo, más del 40% de los HCC tratados con trasplante hepático excedían los criterios de Milan en el análisis del explante, siendo éste un factor de riesgo de recidiva. Estos resultados confirman la utilidad de los criterios de Milán a la hora de detectar los tumores con mayor probabilidad de recidiva para así seleccionar a los pacientes con mayor supervivencia esperada tras el trasplante y de esta forma facilitar el proceso de asignación de órganos, que son cada vez más escasos. Sin embargo, pone de manifiesto la insuficiente precisión de las técnicas de imagen, o bien la variabilidad en la progresión de los HCC, de manera que algunos de ellos progresarían a mayor velocidad de lo esperado, y exceden los criterios de Milán sin ser percibido por los clínicos con la periodicidad de los estudios de imagen empleados en la práctica habitual.

Resulta de particular interés el hecho de que la mayoría de los HCC que excedían Milan lo hacían por multicentricidad, definida como la presencia de 4 tumores o más. El 90% de los HCC únicos asociados a VHC y el 80% de los asociados a alcohol presentaban un tamaño menor de 5 cm en el análisis del explante, lo que podría implicar que las técnicas de imagen empleadas en la clínica son muy precisas para evaluar el tamaño de las lesiones, o bien que la biología de los tumores únicos es diferente de la que presentan los HCC con más de una lesión. Los tumores solitarios presentarían un comportamiento más benigno, y su baja tasa de crecimiento no permitiría que su tamaño se modificara de forma sustancial durante el tiempo en lista de espera de trasplante. Sin embargo, hasta en el 40% de los HCC con 2 o 3 nódulos tumorales al diagnóstico, se detectaron más de 4 nódulos de HCC en el explante. De nuevo esta observación tendría dos explicaciones posibles: por una parte, podría traducir la incapacidad de las técnicas de imagen para diferenciar entre nódulos de HCC de pequeño tamaño y nódulos de

regeneración; por otra, la presencia de más de un nódulo podría ser un marcador de agresividad biológica, de manera que la enfermedad progresaría a mayor velocidad durante la espera hasta el trasplante. De hecho, como se discutirá en detalle en el siguiente apartado, mientras que los pacientes que excedieron los criterios de Milan por tamaño presentaban una supervivencia similar a los pacientes cuyos tumores cumplían los criterios, los pacientes cuyos tumores excedían los criterios de Milan por multicentricidad, mostraron tasas de supervivencia a los 5 años menores que los pacientes con HCC que los cumplían. Sin embargo, este trabajo no es válido para analizar cuál es el motivo que subyace a las diferencias observadas.

#### b. Invasión vascular

En ausencia de enfermedad extrahepática, la invasión vascular es un buen predictor de recurrencia de la enfermedad tras el tratamiento apropiado<sup>155,156</sup>, puesto que es considerada un requisito imprescindible para la diseminación tumoral a distancia.

La invasión vascular fue en nuestro trabajo un predictor de recidiva de HCC tras el trasplante. Estos datos, de nuevo ponen de manifiesto la necesidad de mejorar las técnicas de cribado que detecten la invasión vascular, ya que las actuales de imagen no parecen suficientes para el diagnóstico de invasión microvascular tumoral.

#### c. Polimorfismos genéticos

De todos los polimorfismos analizados, sólo el genotipo CT del polimorfismo -1486C/T de *TLR9* se comporta como un factor de riesgo independiente de recidiva del HCC postrasplante. El conocimiento del efecto de los diferentes SNP en los genes de los *TLRs* y sus promotores es aún insuficiente. Se ha sugerido que la presencia del alelo C en el SNP -1486C/T de *TLR9*, situado en el promotor, podría disminuir la expresión del gen<sup>192</sup> en un estudio en el que se evalúa la presencia de polimorfismos de *TLR9* en diferentes grupos étnicos, en asociación con varias enfermedades. De este trabajo se desprende, asimismo, que existe una diversidad considerable en el gen de *TLR9*, posiblemente asociada a la diferente susceptibilidad individual y racial a la enfermedad. Sin embargo, la evidencia disponible en este sentido es contradictoria, y existen trabajos que proponen que los genotipos mutados en el SNP referido resultarían en un aumento en la expresión génica de *TLR9*<sup>193</sup>.

Llama la atención que sólo el genotipo heterocigoto se comporte como factor de riesgo de recidiva del HCC. En este sentido, otros grupos han comunicado resultados similares en escenarios diferentes. Así, en pacientes que reciben trasplante renal, un grupo coreano relacionó ser portador del genotipo heterocigoto en el polimorfismo -1486 de *TLR9* con un aumento del riesgo de rechazo agudo<sup>194</sup>. En otro trabajo que estudia la

influencia de los polimorfismos genéticos de *TLR9* en la susceptibilidad a la infección sintomática por Citomegalovirus (CMV) en población centroeuropea, se observa que el genotipo CT en este polimorfismo aumenta el riesgo de desarrollar una infección sintomática por CMV<sup>195</sup>.

Algunos trabajos han relacionado directamente a TLR7 y TLR9 con la capacidad del HCC de invasión local y a distancia. En modelos animales de HCC, los agonistas de *TLR9* promueven la invasión local a través de la interacción con componentes de la matriz extracelular<sup>196</sup>, mientras que el tratamiento de células de HCC con antagonistas de *TLR9 in vitro* se acompaña de una marcada reducción en los marcadores de agresividad local del tumor<sup>178</sup>. Asimismo, algunos estudios sugieren que TLR2 y TLR9 podrían actuar como factores proangiogénicos, facilitando la invasión vascular<sup>197</sup>.

Pese a que el genotipo CT en el polimorfismo -1486C>T de *TLR9* fue un factor predictivo de recidiva de HCC, que se mantuvo en el análisis multivariante, es necesario interpretar estos datos con cautela, por el pequeño tamaño de la muestra analizada, y por el insuficiente conocimiento de las vías de señalización activadas en respuesta a la estimulación de los TLRs y sus múltiples interacciones en el ciclo celular, así como de la significación de los polimorfismos genéticos en la expresión y/o función de los TLRs. Sin embargo, si se confirmara esta asociación, podría constituir una herramienta útil, de fácil determinación en cualquier momento de la enfermedad, en el seguimiento clínico de los pacientes que reciben trasplante hepático por HCC, pudiendo formar parte de una firma genética con significación pronóstica que se integre en los actuales algoritmos de decisión para el manejo clínico.

#### 4.2.2 Supervivencia de los pacientes con HCC

La variable de valoración principal en la investigación en el cáncer es la supervivencia global. Por ello, aunque el diseño de este trabajo no permite extraer conclusiones acerca de las variables que se relacionan con la supervivencia del HCC en general, sí es interesante estudiar la supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático, y analizar los factores que influyen sobre ella con el objeto de intentar mejorar la práctica clínica a través de la revisión de la experiencia.

Los datos de supervivencia global de nuestra población son algo mejores que los comunicados en otras series y a los publicados en la memoria del RETH en 2014<sup>130</sup>, con una media de supervivencia de 9,9 años. La supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático en nuestra serie es 62,5% a los 15 años. En el registro español, se ha comunicado una tasa de supervivencia del 72.7, 61.9 y 52% a 5, 10 y 15 años respectivamente<sup>130</sup>. Esto probablemente sea debido a la exclusión de un buen número de los pacientes fallecidos de los que no se disponía de muestra de ADN para el estudio de los polimorfismos en el Biobanco del HUPHM.

Llama la atención en el análisis de la supervivencia de nuestros pacientes la ausencia de diferencias entre los pacientes que reciben trasplante hepático por enfermedad relacionada con VHC y por cirrosis enólica. El trasplante hepático es el único tratamiento eficaz para los pacientes con infección crónica por VHC una vez presentan cirrosis hepática descompensada o HCC, si bien, hasta la reciente generalización del uso de los nuevos antivirales directos, la infección continuaba siendo un problema de primer orden tras el trasplante, puesto que la reinfección del injerto es universal si el procedimiento se realiza en pacientes virémicos. La recurrencia de la infección era la principal causa de fallo del injerto, y el curso de la infección crónica es más acelerada que en la etapa pretrasplante, con una tasa de cirrosis del injerto de entre el 10 y 20% a los 5 años<sup>198-199</sup>.

El análisis de los últimos datos de los Registros de Trasplante, tanto a nivel nacional, como en el resto de Europa y Estados Unidos, muestra una mejoría significativa de la supervivencia obtenida en el resto de indicaciones de trasplante hepático que no se observa en los trasplantes por enfermedad hepática relacionada con el VHC, siendo por tanto la supervivencia en esta indicación menor que en el resto en su conjunto<sup>200</sup>. Atendiendo a los registros de la UNOS (*United Network of Organ Sharing*), los pacientes sometidos a trasplante hepático por cirrosis VHC presentan un incremento de riesgo de muerte respecto a los pacientes trasplantados por otras causas<sup>201</sup>. Lo mismo se observa en los registros nacionales<sup>130</sup>. La causa más probable de que no se observe en nuestra serie esta diferencia en la supervivencia es, de nuevo, la exclusión de pacientes fallecidos por no disponer de muestra de ADN para el análisis de los polimorfismos.

Actualmente, los antivirales directos, que proporcionan elevadas tasas de respuesta viral sostenida y excelente perfil de seguridad, han hecho posible el tratamiento de los pacientes en lista de espera de trasplante, y de aquellos con recidiva de la infección VHC en el injerto, por lo que la recidiva de la infección tras el trasplante está dejando de ser un problema clínico relevante. En los próximos años, se espera que la supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático por cirrosis VHC se iguale a la del resto de las indicaciones. No obstante, es necesario llamar la atención sobre recientes publicaciones que advierten de un posible aumento inesperado del riesgo de HCC tras tratamientos con regímenes libres de interferón<sup>202</sup>, y que los autores ponen en relación con una alteración del balance entre sistema inmune del huésped y las células tumorales residuales al eliminar de forma muy rápida el estímulo antigénico, puesto que el tratamiento con los nuevos antivirales directos negativiza la viremia en sólo unos pocos días.

En pacientes cuidadosamente seleccionados, la supervivencia a largo plazo de los pacientes trasplantados por HCC es similar o sólo ligeramente inferior a la supervivencia de los pacientes sometidos a trasplante hepático por otras causas<sup>44-48</sup>. Aplicando los criterios de selección actuales, la mortalidad esperada al año y a los 5 años es de menos del 10 y del 30% respectivamente. En nuestra población, la media de supervivencia de

los pacientes trasplantados por HCC es similar a la de los pacientes trasplantados por cirrosis. Aunque es necesario interpretar estos datos con prudencia por el sesgo de selección referido en nuestro trabajo, los resultados son acordes con los comunicados en la literatura internacional. Sin embargo, en el ámbito nacional, la supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático por HCC continua siendo inferior a la de los que lo hacen por cirrosis<sup>130</sup>. La etiología del HCC no influyó en la supervivencia, de acuerdo con lo descrito por otros autores.

El factor que impacta de forma más potente en la supervivencia de los pacientes en nuestra población es, como era de esperar, la recidiva del HCC. En una reciente revisión sistemática de 90 estudios, con un total de 17.780 pacientes a lo largo de 15 años, se identificaron los criterios de Milán como factor pronóstico independiente para la evolución de los pacientes tras el trasplante hepático<sup>203</sup>. La supervivencia global a 5 años de los pacientes que cumplían los criterios de Milán fue similar a la de los trasplantados por indicaciones distintas del HCC según los registros europeo (ELTR) y estadounidense (OPTN) (65%–87%)<sup>204-205</sup>.

En nuestra serie, la supervivencia global de los pacientes con tumores que cumplían los criterios de Milan alcanzó el 77,4% a los 5 años. A los 15 años se observa una supervivencia global sólo ligeramente inferior, del 68,5%. Sin embargo, los pacientes cuyos HCC excedían los criterios de Milan por multicentricidad (más de 3 nódulos), presentaron una supervivencia significativamente más baja que los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC que cumplían los criterios de Milan en el explante. Esta diferencia es especialmente evidente al analizar la supervivencia a 5 años; posteriormente las curvas de supervivencia van acercándose, lo que sugiere que el principal factor responsable de la diferencia es la recidiva precoz del HCC. Al analizar la supervivencia de los pacientes cuyos HCC sobrepasaban los criterios de Milan por tamaño (nódulo único mayor de 5cm, o bien 2 o 3 nódulos, mayores de 3cm), no se encontraron diferencias con respecto a los pacientes que cumplían los criterios de Milan.

En el presente trabajo, se ha observado la influencia de distintos polimorfismos de la inmunidad natural en la supervivencia postrasplante de los pacientes con HCC. Así, los pacientes portadores del alelo variante en los polimorfismos analizados en los genes de *TLR8*, y en la posición -1237T>C de *TLR9*, presentan menor supervivencia que los pacientes con los genotipos ancestrales. En los dos SNP, la diferencia de supervivencia se observó sólo en los pacientes trasplantados por HCC, no así en los pacientes que recibieron el trasplante por cirrosis sin HCC.

En el caso del polimorfismo de *IL28B*, cuando se analiza la supervivencia en el subgrupo de pacientes con VHC se observa que los pacientes portadores del genotipo CC presentan mayor supervivencia que los portadores de los genotipos CT y TT; esta

diferencia se observa tanto en los pacientes con HCC como en los pacientes con cirrosis sin HCC, lo que sugiere que el polimorfismo influiría de forma más potente en la evolución de la recidiva de la infección por VHC postrasplante, como se ha comunicado ampliamente en la literatura<sup>87</sup>.

Pese a que el genotipo CT en el polimorfismo -1486C>T de *TLR9* fue un factor predictivo de recidiva de HCC, que a su vez es la circunstancia que más impacta en la supervivencia, no se ha detectado asociación de dicho SNP con la supervivencia. Sin embargo, los pacientes portadores del alelo mutado en el polimorfismo -1237T>C presentan una supervivencia significativamente menor que los pacientes portadores de genotipo salvaje. Ambos polimorfismos se encuentran en el promotor de *TLR9*, y tienen alto grado de ligamiento<sup>192</sup>.

Respecto a los polimorfismos de TLR que se relacionaron con la supervivencia tras el trasplante de los pacientes que recibieron trasplante hepático por HCC, éste es el primer trabajo que sugiere dicha asociación, que debe ser confirmada en nuevos estudios.

---

## 5 LIMITACIONES

---

El presente estudio presenta algunas limitaciones que es necesario considerar a la hora de la interpretación de sus resultados.

En primer lugar, se trata de un estudio observacional retrospectivo, que por tanto presenta limitaciones inherentes al diseño. La principal, es la pérdida de datos de los pacientes fallecidos sin muestra archivada en el Biobanco del HUPHM. Esta ha sido la principal causa de exclusión de los pacientes, y con toda probabilidad explica los mejores resultados de supervivencia observados en nuestra población respecto a los registros nacionales e internacionales. Por otro lado, también en relación con la naturaleza retrospectiva del trabajo, la revisión de historias clínicas es otra fuente de pérdida de datos necesarios para llevar a cabo el estudio.

En segundo lugar, el número de pacientes incluidos ha sido suficiente para detectar diferencias y extraer conclusiones, especialmente si tenemos en cuenta que se trata de una serie de pacientes sometidos a trasplante hepático; sin embargo, en algunos análisis de subgrupos el número de pacientes ha sido pequeño, lo que puede haber introducido sesgos, sobre todo a la hora de no detectar diferencias que realmente sí están presentes. Los análisis de polimorfismos genéticos precisan un gran tamaño muestral para poner de manifiesto su influencia sobre las variables estudiadas. De esta manera, los estudios estratificados en función de los genotipos de los diferentes SNPs podrían no haber detectado diferencias existentes por insuficiente potencia estadística, particularmente cuando se han realizado en subgrupos de pacientes.

En tercer lugar, y en relación con lo anterior, el periodo de observación de este estudio ha sido prolongado, incluyendo pacientes trasplantados desde 1988. Este hecho ha permitido aumentar el número de pacientes del estudio, fundamental en el análisis de polimorfismos genéticos pero, a la vez, introduce variabilidad en el manejo diagnóstico-terapéutico de los enfermos, derivada de la propia evolución de la medicina a lo largo de casi tres décadas. Así, el perfeccionamiento de las técnicas de imagen empleadas en el diagnóstico, el tratamiento locorregional del HCC durante el tiempo en lista de espera de trasplante, los avances en los cuidados intensivos antes y después del trasplante, en el manejo perioperatorio de los pacientes, o en los protocolos de inmunosupresión, entre otros muchos aspectos que se han perfeccionado el campo del trasplante de órgano sólido, hacen que los resultados del trasplante hepático hayan mejorado a lo largo de los años, lo que hace necesario interpretar los resultados de este trabajo, particularmente los que se refieren al análisis de la supervivencia, con cautela.

---

## 6 IMPLICACIONES, APLICABILIDAD Y CONTRIBUCIÓN

---

En este trabajo se han identificado ciertos polimorfismos en componentes de la inmunidad natural que podrían relacionarse con el riesgo de recidiva de HCC postrasplante y e impactar de forma negativa en la supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático por HCC sobre cirrosis VHC o alcohólica.

Se trata de un estudio exploratorio, unicéntrico, y que incluye un número limitado de pacientes, pero si se confirmaran los hallazgos en otras series de pacientes, sería de gran utilidad en la práctica clínica. La determinación de los polimorfismos genéticos es técnicamente sencilla, y basta con realizarla una vez por cada paciente, en cualquier momento de su enfermedad. El conocimiento de factores de riesgo de recidiva, o de mal pronóstico en general, permitiría identificar aquellos pacientes que precisan un seguimiento clínico más estrecho, y podrían influir en la selección del esquema de inmunosupresión.

El HCC muestra un comportamiento biológico muy variable, y es necesario profundizar en el estudio de los factores que lo determinan. Este trabajo supone, en resumen, una contribución a este respecto, identificando algunos polimorfismos genéticos en componentes de la inmunidad natural que podrían influir en la evolución de la enfermedad tras el trasplante.



---

## 6. CONCLUSIONES

---

---

## CONCLUSIONES

---

- 1I Los polimorfismos genéticos de *IL28B* y *TLRs* no se relacionan con el desarrollo de HCC en pacientes con cirrosis VHC ni en pacientes con cirrosis alcohólica. Los polimorfismos genéticos de *TLR9* podrían relacionarse con mayor riesgo de recidiva de HCC postrasplante y con menor supervivencia.
- 2I Se confirma la asociación de los polimorfismos genéticos de *IL28B* y de *TLR7* con la mayor gravedad de la enfermedad crónica por VHC, demostrando un efecto aditivo.
- 3I Las técnicas de imagen infraestiman el estadio tumoral de los HCC, particularmente en los tumores multicéntricos, así como la invasión vascular tumoral.
- 4I Los principales factores de riesgo de HCC han sido, en nuestro estudio, la mayor edad al trasplante y el sexo masculino.
- 5I La tasa de recidiva de HCC postrasplante fue del 12,4%, y se produjo a los 37,8 meses del trasplante de mediana. Los factores de riesgo independientes de recidiva fueron: exceder los criterios de Milan, la presencia de invasión vascular y ser portador del genotipo CT en el polimorfismo -1486C/T de *TLR9*.
- 6I La media de supervivencia de los pacientes que reciben trasplante hepático en nuestra serie es de 9,9 años. El factor que más impacta en la supervivencia es la recidiva del HCC postrasplante, así como presentar cuatro o más nódulos tumorales. Ser portador de las variantes no comunes en el polimorfismo Met1Val de *TLR8* y del genotipo heterocigoto en el polimorfismo -1237T>C de *TLR9* podrían impactar negativamente en la supervivencia de los pacientes, aunque es necesario confirmarlo en otros estudios.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: IARC (International Agency for Research on Cancer); 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, consultada el 11/05/2016.
2. Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, Nakao M, Yabuuchi T, Kitamura T, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med*. 1993;328:1797-1801.
3. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981; 2:1129-1133.
4. Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, You SL, Lu SN, Wang LY, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. 2010;138:1747-1754.
5. Simonetti J, Bulkow L, McMahon BJ, Homan C, Snowball M, Negus S, et al. Clearance of hepatitis B surface antigen and risk of hepatocellular carcinoma in a cohort chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2010;51:1531-1537.
6. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatol Res*. 2007;37(Suppl2):S88-S94.
7. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma. 2004;127(Suppl 1):S87-S96
8. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, et al. Alcohol and hepatocellular carcinoma: The effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*. 2002;155:323-331
9. Parkin DM. Cancer Incidence in five continents. IARC scientific publications volume VIII [No. 155]. 2002. Lyon: IARC Press
10. Altekruse SF, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol*. 2009;27:1485-1491.
11. Bosetti C, Levi F, Boffetta P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from hepatocellular carcinoma in Europe, 1980-2004. *Hepatology*. 2008;48:137-145.
12. Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000;31:777-782.
13. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 2004;127(Suppl 1):S27-S34.
14. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 2004; 127:1372-1380.
15. El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000; 160:3227-3230.

16. Hassan MM, Frome A, Patt YZ, El-Serag HB. Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:266–269.
17. Kulkarni K, Barcak E, El-Serag H, Goodgame R. The impact of immigration on the increasing incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:445–450.
18. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118:3030-3044.
19. Bruix J, Barrera JM, Calvet X, Ercilla G, Costa J, Sanchez-Tapias JM, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet*. 1989 28;2:1004-1006.
20. Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. & Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004;127(suppl 1); S35–S50
21. Kato N, Ji G, Wang Y, Baba M, Hoshida Y, Otsuka M, et al. Large-scale search of single nucleotide polymorphisms for hepatocellular carcinoma susceptibility genes in patients with hepatitis C. *Hepatology*. 2005;42:846-853.
22. Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2011;43:455-458.
23. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, et al. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet*. 2011;43:797-800.
24. Segat L, Fabris A, Padovan L, Milanese M, Pirulli D, Lupo F, et al. MBL2 and MASP2 gene polymorphisms in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. 2008;15:387-391.
25. Eurich D, Boas-Knoop S, Morawietz L, Neuhaus R, Somasundaram R, Ruehl M, et al. Association of mannose-binding-lectin-2-gene polymorphism with the development of hepatitis-C-induced hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2011;31:1006-1012.
26. Morgan RL, Baack B, Smith BD, Yartel A, Pitasi M, Falck-Ytter Y. Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Ann Intern Med*. 2013; 158:329-337.
27. Bruno S, Battezzati PM, Bellati G, Manzin A, Maggioni M, Crosignani A, et al. Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2001;34:748–755.
28. Alvarez MA, Cirera I, Solà R, Bargalló A, Morillas RM, Planas R. Long-term clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis: a prospective study of 165 patients. *J Clin Gastroenterol*. 2011; 45:906-911.
29. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002;36:1206–1213.
30. Grant B, Harford T, Dawson D, Chou P, DuFour M, Pickering R. Prevalence of DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1992. *Alcohol Health Res World* 1994;18:243–248.
31. Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, et al. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2001;7:208–215.

32. Kaczynski J, Hansson G, Hermodsson S, Olsson R, Wallerstedt S. Minor role of hepatitis B and C virus infection in the etiology of hepatocellular carcinoma in a low-endemic area. *Scand J Gastroenterol*. 1996;31:809–813.
33. Hellerbrand C, Hartmann A, Richter G, Knoll A, Wiest R, Scholmerich J, et al. Hepatocellular carcinoma in southern Germany: epidemiological and clinicopathological characteristics and risk factors. *Dig Dis*. 2001;19:345–351.
34. Schoniger-Hekele M, Muller C, Kutilek M, Oesterreicher C, Ferenci P, Gangl A. Hepatocellular carcinoma in Austria: aetiological and clinical characteristics at presentation. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12:941–948.
35. Llovet JM, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*. 1999; 19:329-338.
36. European Association for Study of Liver; European Organisation for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 2012; 48:599-641.
37. Bruix J, Sherman M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 2011;53:1020.
38. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*. 1996;334:693-699.
39. Figueras J, Jaurrieta E, Valls C, Benasco C, Rafecas A, Xiol X, et al. Survival after liver transplantation in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma: a comparative study. *Hepatology*. 1997; 25:1485-1489.
40. Min AD, Saxena R, Thung SN, Atillasoy EO, Wolf DC, Sauter B, et al. Outcome of hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma undergoing liver transplant. *Am J Gastroenterol*. 1998; 93:2148-2153.
41. [Molmenti EP, Klintmalm GB. Liver transplantation in association with hepatocellular carcinoma: an update of the International Tumor Registry. \*Liver Transpl\*. 2002; 8:736-748.](#)
42. Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, Thuluvath PJ. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol*. 2003; 21:4329-4335.
43. [Wong SN, Reddy KR, Keeffe EB, Han SH, Gaglio PJ, Perrillo RP, et al. Comparison of clinical outcomes in chronic hepatitis B liver transplant candidates with and without hepatocellular carcinoma. \*Liver Transpl\*. 2007; 13:334-342.](#)
44. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for endstage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003;124:91-96.
45. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59:318-327.
46. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57:1333–1342.
47. Kim WR. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl 1): S30–S34.

48. Razavi H, Waked I, Sarrazin C, Myers RP, Idilman R, Calinas F, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat.* 2014;21 (Suppl 1):34-59
49. Rein DB, Wittenborn JS, Weinbaum CM, Sabin M, Smith BD, Lesesne SB. Forecasting the morbidity and mortality associated with prevalent cases of pre-cirrhotic chronic hepatitis C in the United States. *Dig Liver Dis.* 2011;43:66-72.
50. Kabiri M, Jazwinski AB, Roberts MS, Schaefer AJ, Chhatwal J. The Changing Burden of Hepatitis C Infection in the United States: Model-based Predictions. *Ann Intern Med.* 2014;161:170–180.
51. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: A tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest.* 2009;119:1745–1754
52. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology.* 2003;125:80-88.
53. Wawrzynowicz-Syczewska M, Kubicka J, Lewandowski Z, Boroń-Kaczmarek A, Radkowski M. Natural history of acute symptomatic hepatitis type C. *Infection.* 2004; 32:138-143.
54. Santantonio T, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, Gentile A, et al. Natural course of acute hepatitis C: a long-term prospective study. *Dig Liver Dis.* 2003; 35:104-113.
55. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA.* 2000; 284:450-456.
56. Liang TJ, Rehermann B, Seeff LB, Hoofnagle JH. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2000; 132:296-305.
57. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(Suppl 1):S35-S46.
58. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2000; 31:828-833.
59. Crosse K, Umeadi OG, Anania FA, Laurin J, Papadimitriou J, Drachenberg C, et al. Racial differences in liver inflammation and fibrosis related to chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2:463-468.
60. Gordon SC, Bayati N, Silverman AL. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. *Hepatology.* 1998;28:562-567.
61. Pontisso P, Ruvoletto MG, Fattovich G, Chemello L, Gallorini A, Ruol A, et al. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis virus infections. *Gastroenterology.* 1993; 105:1529-1533.
62. Sagnelli E, Coppola N, Messina V, Di Caprio D, Marrocco C, Marotta A, et al. HBV superinfection in hepatitis C virus chronic carriers, viral interaction, and clinical course. *Hepatology.* 2002; 36:1285-1291.
63. Raimondo G, Brunetto MR, Pontisso P, Smedile A, Maina AM, Saitta C, et al. Longitudinal evaluation reveals a complex spectrum of virological profiles in hepatitis B virus/hepatitis C virus-coinfected patients. *Hepatology.* 2006; 43:100-107.
64. Bini EJ, Perumalswami PV. Hepatitis B virus infection among American patients with chronic hepatitis C virus infection: prevalence, racial/ethnic differences, and viral interactions. *Hepatology.* 2010; 51:759-766.

65. Squadrito G, Cacciola I, Alibrandi A, Pollicino T, Raimondo G. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2013; 59:696-700.
66. Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV. Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 1998; 27:1730-1735.
67. Wiley TE, McCarthy M, Breidi L, McCarthy M, Layden TJ. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology.* 1998; 28:805-809.
68. Serfaty L, Poujol-Robert A, Carbonell N, Chazouillères O, Poupon RE, Poupon R. Effect of the interaction between steatosis and alcohol intake on liver fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:1807-1812.
69. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, et al. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology.* 1999; 29:1215-1219.
70. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology.* 2003; 125:1695-1704.
71. Huang YW, Yang SS, Fu SC, Wang TC, Hsu CK, Chen DS, et al. Increased risk of cirrhosis and its decompensation in chronic hepatitis C patients with new-onset diabetes: a nationwide cohort study. *Hepatology.* 2014; 60:807-814.
72. Elkrief L, Chouinard P, Bendersky N, Hajage D, Larroque B, Babany G, et al. Diabetes mellitus is an independent prognostic factor for major liver-related outcomes in patients with cirrhosis and chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2014; 60:823-831.
73. Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Carnie J, Heeren T, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2001; 33:562-569.
74. Bica I, McGovern B, Dhar R, Stone D, McGowan K, Scheib R, et al. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:492-497.
75. Sulkowski MS, Mehta SH, Torbenson MS, Higgins Y, Brinkley SC, de Oca RM, et al. Rapid fibrosis progression among HIV/hepatitis C virus-co-infected adults. *AIDS.* 2007; 21:2209-2216.
76. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology.* 1997; 112:463-472.
77. Pineda JA, Aguilar-Guisado M, Rivero A, Girón-González JA, Ruiz-Morales J, Merino D, et al. Natural history of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis.* 2009; 49:1274-1282.
78. Planas R, Ballesté B, Alvarez MA, Rivera M, Montoliu S, Galeras JA, et al. Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. *J Hepatol.* 2004; 40:823-830.
79. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009; 461:798-801.
80. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 2009; 41:1105-1109.



81. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009 17;461:399-401.
82. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138:1338-1345.
83. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41:1100-1104.
84. Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, et al. Common variation of *IL28* affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol*. 2010;53:439–443.
85. Agundez JA, García-Martín E, Maestro ML, Cuenca F, Martínez C, Ortega L, et al. Relation of *IL28B* gene polymorphism with biochemical and histological features in hepatitis C virus-induced liver disease. *Plos One*. 2012;7:e37998.
86. Rembeck K, Alsio A, Christensen PB, Färkkilä M, Langeland N, Buhl MR, et al. Impact of *IL28B*-related single nucleotide polymorphisms on liver histopathology in chronic hepatitis C genotype 2 and 3. *Plos One*. 2012;7:e29370.
87. Cisneros E, Baños I, Citores MJ, Duca A, Salas C, Noblejas A, et al. Increased risk of severe hepatitis C virus recurrence after liver transplantation in patients with a T allele of *IL28B* rs12979860. *Transplantation*. 2012;94:275-279.
88. Meager A, Visvalingam K, Dilger P, Bryan D, Wadhwa M. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine*. 2005;31:109–118.
89. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*. 2003;4:69-77.
90. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003;4:63-68.
91. Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, Paludan SR, Nielsen AL, et al. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J Virol*. 2007;81:7749–7758
92. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T. IFN-lambda is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog*. 2008;14:e1000017.
93. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*. 2006;131:1887-1898.
94. Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators—a new look. *Immunity*. 2001;14:661–664.
95. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K, Trujillo JM, Keating MJ, Gutterman JU. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 1986;314:1065-1069.

96. Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001; 98:3074-3081.
97. Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard JY, Savary J, Chevreau C, et al. Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Français d'Immunothérapie. *N Engl J Med*. 1998;338:1272-1278.
98. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:493-499.
99. Krown SE, Li P, Von Roenn JH, Paredes J, Huang J, Testa MA. Efficacy of low-dose interferon with antiretroviral therapy in Kaposi's sarcoma: a randomized phase II AIDS clinical trials group study. *J Interferon Cytokine Res*. 2002; 22:295-303.
100. Li W, Lewis-Antes A, Huang J, Balan M, Kotenko SV. Regulation of apoptosis by type III interferons. *Cell Prolif*. 2008;41:960-979.
101. Lasfar A, Lewis-Antes A, Smirnov SV, Anantha S, Abushahba W, Tian B, et al. Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer Res*. 2006;66:4468-4477.
102. Sato A, Ohtsuki M, Hata M, Kobayashi E, Murakami T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol*. 2006;176:7686-7694.
103. Numasaki M, Tagawa M, Iwata F, Suzuki T, Nakamura A, Okada M, et al. IL-28 elicits antitumor responses against murine fibrosarcoma. *J Immunol*. 2007;178:5086-5098.
104. Abushahba W, Balan M, Castaneda I, Yuan Y, Reuhl K, Raveche E, et al. Antitumor activity of type I and type III interferons in BNL hepatoma model. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59:1059-1071.
105. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
106. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86:973-1983.
107. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394-397.
108. Takeda K and Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17:1-14.
109. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.
110. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13766-13771.
111. Imran M, Waheed Y, Manzoor S, Bilal M, Ashraf W, Ali M, et al. Interaction of Hepatitis C virus proteins with pattern recognition receptors. *Viol J*. 2012;9:126-133.
112. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373-384.
113. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*. 2004;5:975-979.

114. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, et al. *TLR4* polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:16645-16650.
115. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, et al. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of Gram-negative infections. *Infect Dis*. 2002;186:1522–1525.
116. Ogun AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, et al. The Arg753Gln polymorphism of the Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur Respir J*. 2004;23:219–223.
117. Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between toll-like receptors polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. *Lupus* 2016; 25:593-601.
118. Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, Naiki Y, Koide N, Mori I, et al. Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC cancer*. 2006;6:281–288.
119. Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, et al. Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate*. 2007;67:774–781.
120. Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, et al. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*. 2005; 6: 1-8.
121. Molteni M, Marabella D, Orlandi C, Rossetti C. Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express *TLR-4*. *Cancer Lett*. 2006;235:75–83.
122. Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. *TLR* signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene*. 2008;27:218–224.
123. Kansagara D, Papak J, Pasha AS, O'Neil M, Freeman M, Relevo R, et al. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic liver disease: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2014;161:261-269.
124. Cramp ME. HBV HCV HCC? *Gut*. 1999;45:168–169.
125. Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 1998;75:347-354.
126. Benvegnù L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. A prospective study. *Cancer*. 1994;74:2442-2448.
127. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, et al. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC Study. *Int J Cancer*. 1999;81:695-699.
128. Instituto Nacional de la Salud de Norteamérica. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> (consultada el 1 de mayo de 2013).
129. Calculadora online “Simple Hardy-Weinberg calculator-Court lab” (Universidad de Tufts, Boston, MA). [http://emerald.tufts.edu/~mcourt01/lab\\_protocols.htm](http://emerald.tufts.edu/~mcourt01/lab_protocols.htm)
130. Memoria del Registro Español de Trasplante Hepático 2014. <http://www.ont.es/infesp/Paginas/RegistroHepatico.aspx> (consultada el 1 de mayo de 2016)
131. Allison ME, Wreghitt T, Palmer CR, Alexander GJ. Evidence for a link between hepatitis C virus infection and diabetes mellitus in a cirrhotic population. *J Hepatol*. 1994;21:1135-1139.

132. Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C and virus infection fibrosis progression. *Gastroenterology*. 2003;125:1695-1704.
133. Hickman IJ, Powell EE, Prins JB, Clouston AD, Ash S, Purdie DM, Jonsson JR. In overweight patients with chronic hepatitis C, circulating insulin is associated with hepatic fibrosis: implications for therapy. *J Hepatol*. 2003; 39:1042-1048.
134. Duca AM, de la Fuente S, Citores MJ, Cuenca AB, Cisneros E, Escamilla N, et al. CC genotype at rs12979860 of *IL28B* is associated with lower risk of new-onset diabetes after transplantation in adult patients with liver transplantation for hepatitis C cirrhosis. *Transplant Proc*. 2014;46:3114-3116
135. Veldt BJ, Duarte-Rojo A, Thompson AJ, Watt KD, Heimbach JK, Tillmann HL, et al. Recipient *IL28B* polymorphism is an important independent predictor of posttransplant diabetes mellitus in liver transplant patients with chronic hepatitis C. *Am J Transplant*. 2012;12:737-744.
136. Fabris C, Falleti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Bignulin S, et al. IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *J Hepatol*. 2011; 54:716-722.
137. Sawhney R, Visvanathan K. Polymorphisms of toll-like receptors and their pathways in viral hepatitis. *Antivir Ther*. 2011;16:443-58
138. Poynard T, Ratzu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol* 2001;34:730–739.
139. Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, et al. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol*. 2007;47:203-11.
140. Schott E, Witt H, Neumann K, et al. Association of *TLR7* single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon-a-based therapy. *J Viral Hepat* 2008; 15:71–78.
141. Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Association between Toll-like receptor polymorphisms and the outcome of liver transplantation for chronic hepatitis C virus. *Transplantation* 2007; 84:511–516.
142. Montes AH, Asensi V, Alvarez V, Valle E, Ocaña MG, Meana A, et al. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006; 143:404-413.
143. Citores MJ, Pérez-Pulgar S, Duca A, Crespo G, de la Fuente S, Vilches C, et al. Rapidity of fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C is influenced by toll-like receptor 3 polymorphism. *Clin Transplant*. 2016;30:810-818.
144. Askar E, Bregadze R, Mertens J, Schweyer S, Rosenberger A, Ramadori G, et al. *TLR3* gene polymorphisms and liver disease manifestations in chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 2009;81:1204-11.
145. Guo J, Loke J, Zheng F, et al. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Tol-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses. *Hepatology* 2009; 49:960–968.
146. Li Y, Chang M, Abar O, et al. Multiple variants in Toll- like receptor 4 gene modulate risk of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2009; 51:750–757.

147. Inokuchi S, Tsukamoto H, Park EJ, Liu ZX, Brenner DA and Seki E. Toll-like receptor 4 mediates alcohol-induced steatohepatitis through bone marrow-derived and endogenous liver cells in mice. *Alcohol. Clin Exp Res.* 2011;35:1509–1518.
148. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alphafetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:513–523.
149. Burrel M, Llovet JM, Ayuso C, Iglesias C, Sala M, Miquel R, et al. MRI angiography is superior to helical CT for detection of HCC prior to liver transplantation: an explant correlation. *Hepatology* 2003;38:1034–1042.
150. <http://www.tsanz.com.au/organallocationprotocols/index.asp> (consultada en diciembre de 2015)
151. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Metroticket Investigator Study Group. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *Lancet Oncol.* 2009;10:35-43.
152. Raj A, McCall J, Gane E. Validation of the “Metroticket” predictor in a cohort of patients transplanted for predominantly HBV-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2011;55:1063–1068
153. Vauthey JN, Lauwers GY, Esnaola NF, Do KA, Belghiti J, Mirza N, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002;20:1527-1533.
154. [Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. \*Hepatology.\* 2001; 33:1394-1403.](#)
155. Zavaglia C, De Carlis L, Alberti AB, Minola E, Belli LS, Slim AO, et al. Predictors of long-term survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:2708-2716.
156. Dudek K, Kornasiewicz O, Remiszewski P, Kobryń K, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Górnicka B, et al. Impact of tumor characteristic on the outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc.* 2009;41:3135-3137.
157. Ryeson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, Ward JW, Jemal A, Sherman RL, et al. Annual Report of the Nation on the Status of Cancer, 1972-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. *Cancer.* 2016; 122:1312-1337.
158. Trevisani F, Cantarini MC, Labate AM, De Notariis S, Rapaccini G, Farinati F, et al. Surveillance for hepatocellular carcinoma in elderly Italian patients with cirrhosis: effects on cancer staging and patient survival. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1470–1476.
159. Yuen MF, Cheng CC, Laufer JJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatol Balt Md.* 2000;31:330–335.
160. Sangiovanni A, Del Ninno E, Fasani P, De Fazio C, Ronchi G, Romeo R, et al. Increased survival of cirrhotic patients with a hepatocellular carcinoma detected during surveillance. *Gastroenterology.* 2004;126:1005–1014.
161. Barbara L, Benzi G, Gaiani S, Fusconi F, Zironi G, Siringo S, et al. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology.* 1992;16: 132-137.

162. Sheu J, Sung J, Chen D, Yang P, Lai M, Lee C, et al. Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *Gastroenterology*. 1985;89:259-266.
163. Cheng SJ, Freeman RB Jr, Wong JB. Predicting the probability of progression-free survival in patients with small hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2002;8:323-328.
164. Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al; HALT-C Trial Group. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*. 2009;136:138-148.
165. Agúndez JA, García-Martin E, Maestro ML, Cuenca F, Martínez C, Ortega L, et al. Relation of *IL28B* gene polymorphism with biochemical and histological features in hepatitis C virus-induced liver disease. *PLoS One*. 2012;7:e37998.
166. Akkiz H, Kuran S, Akgöllü E, Uskudar O, Bekar A and Bayram S. The role of Interleukin 28B gene polymorphism in Turkish patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol*. 2014;13:788-795.
167. Joshita S, Umemura T, Katsuyama Y, Ichikawa Y, Kimura T, Morita S, et al. Association of *IL28B* gene polymorphism with development of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol*. 2012;73:298-300.
168. Eurich D, Boas-Knoop S, Bahra M, Neuhaus R, Somasundaram R, Neuhaus P, et al. Role of *IL28B* polymorphism in the development of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma, graft fibrosis, and posttransplant antiviral therapy. *Transplantation*. 2012;93:644-649.
169. Ren S, Lu J, Du X, Huang Y, Ma L, Huo H, et al. Genetic variation in *IL28B* is associated with the development of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61:1433-1439.
170. Lee DH, Cho Y, Seo JY, Kwon JH, Cho EJ, Jang ES, et al. Polymorphisms near interleukin 28B gene are not associated with hepatitis B virus clearance, hepatitis B e antigen clearance and hepatocellular carcinoma occurrence. *Intervirology*. 2013;56:84-90.
171. Chen J, Wang L, Li Y, Cai B, Fu Y, Liao Y, et al. Association analysis between SNPs in IL-28B gene and the progress of hepatitis B infection in Han Chinese. *PLoS One*. 2012;7:e50787.
172. Suo GJ, Zhao ZX. Association of the interleukin-28B gene polymorphism with development of hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2013;12:3708-3717
173. He J, Yu G, Li Z, Liang H. Influence of interleukin-28B polymorphism on progression to hepatitis virus-induced hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2014;35:8757-8763.
174. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:471-484.
175. Schmidt C. Immune system's Toll-like receptors have good opportunity for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:574 -575.
176. Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, Hedelin M, Li L, Adami HO, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the Cancer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res*. 2004;64:2918-2922.
177. Tanaka J, Sugimoto K, Shiraki K, et al. Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*. 2010; 37:805-814.

178. Mohamed FE, Al-Jehani RM, Minogue SS, Andreola F, Winstanley A, Olde Damink S, et al. Effect of toll-like receptor 7 and 9 targeted therapy to prevent the development of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2015;35:1063-1076.
179. Cabibbo G, Enea M, Attanasio M, Bruix J, Craxi A, Gammà C. A metaanalysis of survival rates of untreated patients in randomized clinical trials of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010;51:1274-1283.
180. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology.* 2006;49:138–151.
181. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:1446–1452.
182. Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:1437–1447.
183. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359:1995–2004
184. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68:6779–88.
185. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69:7385–92.
186. Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology.* 2004;40:667–76.
187. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology.* 2007;45:42–52.
188. Nault J-C, de Reyniès A, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, et al. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology.* 2013;145:176–87.
189. Llovet JM, Peña C, Shan M, Lathia C, Bruix J. Biomarkers predicting outcome of patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) randomized in the phase III SHARP trial. Presidential plenary session, AASLD 59th annual meeting, San Francisco. *Hepatology.* 2008;48:372A
190. Vivarelli M, Cuchetti A, Piscaglia F, La Barba G, Bolondi L, Cavallari A, et al. Analysis of risks factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: key role of immunosuppression. *Liver Transplantation* 2005; 11: 497-503.
191. Halazun KJ, Najjar M, Abdelmessih RM, Samstein B, Griesemer AD, Guarrera JV, et al. Recurrence After Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: A New MORAL to the Story. *Ann Surg.* 2016 Sep 16 (on print).
192. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (*TLR9*): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three US ethnic groups and exploratory case–control disease association studies. *Genomics* 2003;81:85–91.

193. Novak N, Yu CF, Bussmann C, Maintz L, Peng WM, Hart J, et al. Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy*. 2007; 62: 766–772.
194. Kim TH, Jeong KH, Kim SK, Lee SH, Ihm CG, Lee TW, et al. TLR9 gene polymorphism (rs187084, rs352140): association with acute rejection and estimated glomerular filtration rate in renal transplant recipients. *Int J Immunogenet*. 2013;40:502-508.
195. Paradowska E, Jabłońska A, Studzińska M, Skowrońska K, Suski P, Wiśniewska-Ligier M, et al. TLR9 -1486T/C and 2848C/T SNPs Are Associated with Human Cytomegalovirus Infection in Infants. *PLoS One*. 2016;22;11:e0154100.
196. Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res*. 2006;4:437-447.
197. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, et al. Helicobacter pylori-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through *TLR2/TLR9* and promoter regulation. *J Immunol* 2005; 175:8242–8252.
198. Berenguer M. Natural history of recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 2002; 8(10 suppl 1): S14.
199. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Rayón JM, Mora J, Pastor M, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000; 32 (4 Pt 1): 852–858.
200. Thuluvath PJ, Guidinger MK, Fung JJ, Johnson LB, Rayhill SC, Pelletier SJ. Liver transplantation in the United States, 1999-2008. *Am J Transplant* 2010; 10:1003.
201. <https://www.unos.org/>, consultada en mayo de 2016
202. Reig M, Mariño Z, Perelló C, Iñarrairaegui M, Ribeiro A, Lens S, et al. Unexpected high rate of early tumor recurrence in patients with HCV-related HCC undergoing interferon-free therapy. *J Hepatol*. 2016;65:719-726.
203. Mazzaferro V, Bhoori S, Sposito C, Bongini M, Langer M, Miceli R, et al. Milan criteria in liver transplantation for HCC: an evidence-based analysis on 15 years of experience. *Liver Transpl* 2011;17:S44–S57.
204. ELTR – European Liver Transplant Registry. ; 2014 [consultada en mayo de 2016].
205. OPTN – Organ Procurement and Transplantation Network. ; 2014 [consultada en mayo de 2016].



## 8. ANEXOS

Los resultados parciales de este trabajo se han comunicado en los siguientes congresos:

- De la Fuente S, Citores MJ, Cisneros E, Cuenca AB, Baños I, Duca A, Escamilla N, Cuervas-Mons V. **IL28B Rs12979860 TT Genotype Is Overrepresented in Patients With Hepatitis C Virus Induced Hepatocellular Carcinoma. Póster. 2014 Joint International Congress of ILTS, ELITA and LICAGE. Londres, 4-7 Junio 2014.**
- De la Fuente S, Citores MJ, Cuenca AB, Baños A, Duca A, Escamilla N, Cuervas-Mons V. Polimorfismo rs12979860 de la IL28B y hepatocarcinoma en pacientes que van a recibir un trasplante hepático por cirrosis por VHC genotipo 1. Comunicación oral. III Congreso de la Sociedad Española de Trasplante. Valencia, 8-10 Junio 2014.
- De la Fuente S, Citores MJ, Cuenca AB, Baños A, Duca A, Escamilla N, Cuervas-Mons V. *IL28B* Rs12979860 TT is Overexpressed in Patients Undergoing Liver Transplantation for Hepatitis C Virus Genotype 1 Cirrhosis who also have Hepatocellular Carcinoma. Póster. ESOT+AST personalized Transplantation. From new diagnostics to new therapeutics. Madrid, 17-19 Octubre 2014.
- De la Fuente S, Citores MJ, Duca A, Cisneros E, Baños I, Vilches C, Cuervas-Mons Martínez V. El genotipo TT de la Interleuquina-28B rs12979860 es frecuente en los pacientes con cirrosis asociada al virus de la hepatitis C pero no influye en la hepatocarcinogénesis. Póster. VI Congreso de la Sociedad Madrileña de Trasplantes. Madrid, 18-20 Noviembre 2015.

También han dado lugar a la siguiente publicación:

- De la Fuente S, Citores MJ, Duca A, Cisneros E, Baños I, Vilches C, Cuervas-Mons V. Interleukin28B TT genotype is frequently found in patients with hepatitis C virus cirrhosis but does not influence hepatocarcinogenesis. Clin Exp Med. 2016 Apr 15.

Se adjunta en el Anexo 1.

---

## ANEXO 1

---

### **Interleukin-28B TT genotype is frequently found in patients with hepatitis C virus cirrhosis but does not influence hepatocarcinogenesis.**

De la Fuente S, Citores MJ, Duca A, Cisneros E, Baños I, Vilches C, Cuervas-Mons V.

#### **ABSTRACT:**

Introducción: La infección crónica por VHC produce fibrosis hepática progresiva y, finalmente, HCC. El polimorfismo rs12979860 de *IL28B* se ha asociado con la progresión de la fibrosis en la hepatitis C crónica. *IL28B* codifica para IFN- $\lambda$ , que presenta actividad antiviral y antitumoral. El objetivo del estudio fue determinar si el polimorfismo rs12979860 de *IL28B* está relacionado con el desarrollo de HCC tanto en pacientes con cirrosis VHC como en cirrosis de otras etiologías.

Material y métodos: Se analizó el polimorfismo de *IL28B* en 311 pacientes que recibieron trasplante hepático en nuestro centro, bien por cirrosis asociada a VHC (n=202), como por cirrosis alcohólica (n=109).

Resultados: Los pacientes con infección por VHC fueron mayores ( $p=0.012$ ) y los pacientes con cirrosis alcohólica presentaron un predominio del sexo masculino ( $p<0.001$ ). Tanto el genotipo TT en el polimorfismo rs12979860 de *IL28B* (OR 6,08, CI 95% 2,11-17,53;  $p<0.001$ ) como el alelo T (TT+CT vs CC: OR 2,3, IC 95% 1.42–3.72;  $p = 0.001$ ) fueron más frecuentes en pacientes infectados por VHC que en pacientes con cirrosis alcohólica, particularmente en los pacientes infectados por genotipo 1 del VHC. La incidencia de HCC fue mayor entre los pacientes con cirrosis VHC que en los pacientes con cirrosis alcohólica (OR: 2,7, IC 95 % 1,5–4,7;  $p<0.001$ ), sin diferencias respecto al genotipo viral. La distribución genotípica en el polimorfismo de *IL28B* fue similar entre los pacientes con y sin HCC, tanto en los pacientes con cirrosis VHC ( $p=0,84$ ), independientemente del genotipo viral, como en los pacientes con cirrosis alcohólica ( $p=0,91$ ). El análisis multivariante mostró que la mayor edad (OR 1.06, IC 95 % 1.02–1.1;  $p = 0.003$ ) y el sexo masculino (OR 2.49, IC 95 % 1.24–5;  $p = 0.01$ ) eran factores de riesgo independientes para el desarrollo de HCC.

Conclusión: el presente estudio no encontró una asociación significativa entre el polimorfismo rs12979860 de *IL28B* y la hepatocarcinogénesis.

Clin Exp Med. 2016 Apr 15.